



EFFECTO Y MODO DE ACCIÓN DE LA APLICACIÓN FOLIAR DE UREA SOBRE PERALES CV. *WILLIAMS BON CHRETIEN* EN FLORACIÓN

Ing. Agr. Mariela Curetti

Tesis para optar al grado académico de

**MASTER OF SCIENTIA EN FRUTICULTURA
DE CLIMA TEMPLADO-FRÍO**

INTA ALTO VALLE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA

GENERAL ROCA, 1 DE DICIEMBRE DE 2009

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la problemática

La Argentina lidera la producción de peras en el Hemisferio Sur y es el primer exportador mundial (Altube *et al.*, 2007). Los principales destinos de exportación de las peras argentinas son la Comunidad Económica Europea (CEE), Rusia, Brasil y Estados Unidos (EEUU) (Zubeldía H., 2007). Los principales países destino dentro de la CEE son Italia, Holanda, Bélgica, Francia, España e Inglaterra. La calidad de la pera argentina es reconocida en el mundo y se logra gracias a las excelentes condiciones climáticas de la principal zona productora, conformada por los valles del Río Negro y Neuquén. Según el Censo más reciente, la superficie ocupada por perales (*Pyrus communis* L.) en la Patagonia supera las 17.500 has. El peral cv. *Williams Bon Chretien*, más conocido como *Williams*, es la principal variedad y ocupa más del 47 % de dicha superficie (CAR 2005). Entre el año 1993 y el 2005 la superficie cultivada con perales cv. *Williams* se incrementó en un 50% (Boltshauser *et al.*, 2007) por lo cual cerca del 40 % de las plantas tienen menos de diez años. La elevada oferta de peras de esta variedad concentrada en pocas semanas genera serios problemas en su procesamiento en los empaques de la región y su posterior comercialización.

La cosecha de pera *Williams* esta íntimamente ligada al calibre de la fruta. En los primeros días posteriores a la autorización del inicio de la cosecha, se realiza una primera recolección de fruta primicia, la cual presenta un valor comercial superior. Sin embargo un limitado número de frutos logra el tamaño comercial en forma temprana. Sumado a esto, la sobreoferta actual se acompaña de mayores exigencias en la calidad de la fruta comercializada, por lo que el tamaño de la misma se convierte en un factor excluyente. Por todo esto, se busca incrementar el rendimiento y el tamaño de los frutos de primicia.

Una de las prácticas culturales que influye sobre el calibre de los frutos es el raleo. El raleo es la eliminación del exceso de flores y/o de pequeños frutos para compatibilizar la carga frutal con la capacidad nutritiva de los árboles y lograr una mejor calidad de los frutos en la cosecha (Benítez *et al.*, 2005). Esta práctica cultural tiene un gran impacto en el tamaño final de los frutos remanentes y ha sido largamente estudiada, especialmente en manzano (*Malus domestica* L. Borkh) (Wertheim, 1997; Dennis, 2000; Link, 2000; Wertheim, 2000). El tamaño final del fruto puede ser visto como el resultado del número de células y el tamaño celular (Westwood *et al.*, 1967). Generalmente el número de células en la manzana está determinado en los primeros 35-50 días después de plena floración (Denne, 1960). Después de la fase de división celular, el incremento en el tamaño del fruto depende del alargamiento de las células (Harada *et al.*, 2005).

El raleo puede estimular el crecimiento del fruto mediante el estímulo de la división celular (tasa o duración), el incremento del alargamiento celular, un mayor espacio intercelular o la combinación de estos procesos (Goffinet *et al.*, 1995). En pera, la división celular parece ser más importante que el alargamiento celular en la determinación del tamaño final del fruto (Zhang *et al.*, 2006).

El raleo de frutos puede ser realizado en forma manual pero esta modalidad además de resultar sumamente costosa, no puede ser concluida dentro del período adecuado para modificar la producción alternada (Castro, 1992). Otro problema relacionado con el raleo manual, además de su elevado costo, es la dificultad para conseguir mano de obra calificada. Por lo tanto, el raleo químico de frutos es la práctica más aconsejada por resultar económico en su realización y poder concretarse en forma rápida y oportuna (Castro, 1992).

El raleo químico de pequeños frutos se ha logrado exitosamente en las principales variedades de manzano cultivadas en Argentina (Benítez *et al.*, 2005). En cambio en perales, el raleo químico no es una práctica generalizada (Villarreal & Santagni, 2004), debido a que los efectos pueden ser muy variables según la edad y el vigor de la planta, la carga frutal y las condiciones climáticas (Bramardi, 1995). Entre los raleadores químicos, una alternativa posible son los raleadores de flores, en donde se disminuye la carga frutal desde el inicio del crecimiento de los frutos con lo cual se reduce la competencia desde el comienzo del período de división celular.

Entre los productos aplicados en floración se encuentra la urea (Dennis, 2000). La aplicación foliar de urea en plena floración es una práctica que ha demostrado causar un efecto raleador en varias especies frutales: duraznos y nectarines (*Prunus persica* L. Batch) (Zilkah *et al.*, 1988), olivo (*Olea europaea* L.) (Barattà *et al.*, 1990), manzano (*Malus domestica* L. Borkh) (Basak A., 1993; Wertheim S.J., 2000; Hanschack & Alexander, 2002) y pistacho (*Pistacea vera* L.) (Rahemi & Ramezanian., 2007). Esta práctica ha sido extensamente estudiada sobre manzanos en Alemania debido a que en dicho país no se encuentra registrado ningún raleador químico (Link, 2000). Por lo general, las concentraciones empleadas se encuentran entre 3% y 12 % (Zilkah *et al.* 1988; Barattà *et al.*, 1990; Basak, 1993; Wertheim, 2000, Hanschack & Alexander, 2002; Rahemi & Ramezanian, 2007). Experiencias recientes en el Alto Valle de Río Negro dan cuenta que aplicaciones foliares de urea con concentraciones entre 5 y 7,5 % en plena floración provocan un incremento en el tamaño de pera cv. *Williams* (Sánchez *et al.*, 2007).

Los mecanismos fisiológicos o bioquímicos por los cuales, la aplicación foliar de urea incrementa el tamaño de la fruta no han sido esclarecidos. Es interesante destacar que la urea aumenta el tamaño de la fruta, más de lo que se podría esperar debido a su posible efecto raleador (Sánchez *et al.*, 2007). El mismo fenómeno fue observado en manzano (Zimmer, 1996; Handschack & Alexander, 2002), donde además los autores mencionan que los árboles pulverizados con urea en floración presentaban un mayor contenido de nitrógeno en las hojas.

Al parecer además del efecto raleador, la urea, reconocido fertilizante de aplicación foliar en la producción agrícola mundial (Wójcik, 2004; Wang W. *et al.*, 2008) podría tener un importante efecto nutricional en los pequeños frutos en desarrollo (Sánchez *et al.*, 2007). En los primeros días de la primavera, la absorción radical de nitrógeno de los árboles caducifolios se encuentra fuertemente limitada y el crecimiento inicial depende casi exclusivamente de la removilización de reservas nitrogenadas en tejidos perennes del árbol (Sánchez *et al.*, 1990^b, 1991; Millard, 1996; Tagliavini *et al.*, 1997; Tagliavini & Millard, 2005). Queda por esclarecer el efecto nutricional de la aplicación de urea en altas concentraciones sobre destinos vegetativos y reproductivos en los primeros días luego de la floración.

En manzanos, se observan severas necrosis foliares días después de aplicar altas concentraciones de urea en floración (Link, 2000; Wertheim, 2000). También en aplicaciones en poscosecha sobre perales, la urea genera necrosis en los márgenes de las hojas (Sánchez *et al.*, 1990^a). Por el contrario, la aplicación de urea al 5% en el momento de plena floración, no manifiesta ningún efecto visible sobre las hojas de los perales. En floración, las hojas de peral se encuentran menos expuestas que las de manzano (Nielsen *et al.*, 1997) y es posible que intercepten una menor cantidad de fertilizante.

En aplicaciones foliares, la urea es degradada en el citoplasma generando amonio (NH_4^+), el cual es incorporado inmediatamente a un aminoácido (Witte *et al.*, 2002; Wang W. *et al.*, 2008). Cuando la solución de urea aplicada es muy concentrada, la planta no logra incorporarlo con suficiente rapidez y grandes cantidades de amonio se acumulan en la hoja. El amonio es un producto tóxico (Sánchez, 1999) y puede generar síntomas de toxicidad en las plantas (Britto & Krozucker, 2002). Se han postulado varias hipótesis para explicar por qué el NH_4^+ es tóxico para las plantas (Britto *et al.*, 2001^a) pero los mecanismos moleculares y bioquímicos de la fitotoxicidad todavía necesitan ser dilucidados (Wang W. *et al.*, 2008). En tal sentido, concentraciones altas de amonio en el citosol inducen la generación de especies activas del oxígeno (EAO) (Zhu *et al.*, 2000; Wang C. *et al.*, 2008). Las EAO son extremadamente reactivas y oxidan todo tipo de componentes celulares afectando el metabolismo celular de la planta (Davies, 1987; Mittler, 2002; Møller *et al.*, 2007; Luna *et al.*, 2006).

1.2 Objetivos

1.2.1 *Objetivo general*

Evaluar el efecto y establecer el modo de acción de la aplicación foliar de urea sobre perales cv. *Williams Bon Chretien* en floración.

1.2.2 *Objetivos específicos*

- 1) Determinar el efecto sobre el cuaje y la caída de frutos en la planta.
- 2) Estudiar el efecto sobre el rendimiento y el tamaño de los frutos.
- 3) Cuantificar el número y tamaño de las células del fruto en el momento de la cosecha.
- 4) Evaluar destinos, partición e importancia del nitrógeno proveniente de la urea.
- 5) Caracterizar la posible participación del daño oxidativo generado por la aplicación foliar de urea en alta concentración.

1.3 Hipótesis

La aplicación foliar de urea al 5 % en plena floración sobre peral cv. *Williams* actúa

- a) como un raleador temprano, disminuyendo la competencia entre frutos, estimulando la división celular e incrementando el tamaño de los frutos.
- b) mejorando la nutrición nitrogenada de los dardos en los primeros días después de la floración, sin causar daño oxidativo.

2 ANTECEDENTES

2.1 El empleo de la urea como raleador

El más importante raleador de floración utilizado en el pasado fue el DNOC (Di Nitro Orto Cresol) (Dennis, 2000; Wertheim, 2000). El DNOC es un compuesto cáustico que deseca los tejidos receptivos del estigma de las flores del manzano, con lo cual inhibe la germinación del polen (MacDaniels & Hildebrand, 1940). En 1989 la producción de DNOC se discontinuó debido a inquietudes ambientales, ya que contenía metales pesados (Dennis 2000). Luego de la pérdida del DNOC, han surgido varios raleadores de flores nuevos, entre los que se encuentra la urea (Dennis, 2000; Wertheim, 2000). La urea es un componente natural en plantas y humanos por lo cual presenta ventajas frente a otros compuestos sintéticos, los cuales pueden ser peligrosos para la salud humana (Zilkah *et al.*, 1988).

Zilkah *et al.* (1988) fueron los primeros en estudiar el empleo de la urea como raleador. En Israel, los autores evaluaron la aplicación de distintas concentraciones de urea (4, 8, 12 y 16%) en tres momentos: yema rosada, plena floración y fruto cuajado, sobre cuatro variedades de duraznos y nectarines (*Prunus persica* L. Batch). Respecto al momento de aplicación, los autores encontraron que las flores abiertas son más sensibles que las yemas rosadas o los pequeños frutos cuajados. En la mayoría de los casos la concentración óptima se encontró entre 8 y 12 % y la caída de los frutos se produjo entre una y dos semanas luego de la aplicación. El número de frutos respecto al número de flores se denomina “cuaje” o *fruit set*. En la cosecha, las plantas pulverizadas presentaban un cuaje de alrededor del 15 % frente a valores de cuaje superiores al 50 % en plantas testigos.

Barattà *et al.* (1990) estudiaron el efecto raleador de la urea sobre olivos (*Olea europaea* L.). Evaluaron distintas concentraciones (2, 4 y 6%) en tres momentos: plena floración, 10 DDPF (Días Después de Plena Floración) y 20 DDPF. La urea sólo tuvo efecto raleador cuando fue aplicada 20 DDPF. Los árboles pulverizados con urea al 6% 20 DDPF presentaron 50 % menos de frutos en la cosecha.

Más recientemente, Rahemi & Ramezani (2007) evaluaron la aplicación de urea (2,5-5%) 10 DDPF sobre pistacho (*Pistacia vera* L.) durante dos años. Ambas concentraciones de urea incrementaron entre 10 y 20 % la caída de frutos durante las dos primeras semanas respecto al control.

En Alemania, donde no hay registrado ningún raleador químico, se ha estudiado extensamente el uso de urea en altas concentraciones (4-8%) como raleador en manzanos (*Malus domestica* L. Borkh.) (Link, 2000; Wertheim, 2000; Handschack & Alexander, 2002). Basak (1993) encuentra un efecto raleador efectivo de la urea aplicada en floración (3-6%) o

incluso al final de la caída de pétalos (en una concentración menor, 1,5 - 3 %) sobre manzanos cv. *Gala* y cv. *Gloster*. Graf (1996) recomienda aplicaciones de urea al 3-4% al inicio de plena floración en árboles con abundante floración (citado de Wertheim, 2000). Sin embargo, se encuentran casos en los cuales la urea no ralea de manera efectiva por lo que su efecto no es consistente (Graf & Hilbers, 1995; Zimmer *et al.*, 1996).

Handsack & Alexander (2002) evaluaron la aplicación de urea al 3-8% al inicio de la floración sobre siete variedades de manzanos en cuatro años sucesivos. La urea demostró un limitado efecto raleador con ligeras diferencias respecto a las plantas testigo. Promediando todos años evaluados, la urea sólo disminuyó el número de frutos por ramillete floral (*cuaje*) en un 5 %. Mayores efectos encontraron Schröder & Link (2002) con aplicaciones de urea al 4% sobre tres variedades de manzano durante cuatro años. La aplicación fue realizada en dos momentos: fin de yema hinchada o caída de pétalos. La aplicación en yema hinchada disminuyó el cuaje entre 25 y 65 % y la producción del árbol entre 10 y 45 %. En tanto que la aplicación en caída de pétalos tuvo un efecto menor: disminuyó el cuaje entre 15 y 40 % y la producción del árbol en un 12 %.

En peral (*Pyrus communis* L.), sólo hay un trabajo acerca del raleo con aplicaciones foliares de urea en plena floración. Sánchez *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la urea (5-7,5%) sobre perales cv. *Williams* durante tres años en Argentina y Estados Unidos. Los ensayos no han sido concluyentes en cuanto a verificar el efecto raleador de la urea sobre los perales pero en los Estados Unidos la pulverización de urea en plena floración disminuyó en la cosecha el número de frutos por ramillete floral entre un 20 y un 35 %.

2.1.1 Modo de acción de la urea en el raleo

La caída de flores y frutos depende de cambios hormonales en la zona de abscisión situada en la base del pedicelo. Mientras que una cantidad suficiente de auxinas, más específicamente AIA (Ácido Indol Acético), se mueva desde el órgano de la planta a través de esta zona, la caída no ocurre. Si el transporte basipolar de auxinas disminuye por debajo de cierto nivel se estimula la liberación de etileno, hormona gaseosa (Bangerth, 2000; Wertheim, 2000). En la zona de abscisión, el etileno es reconocido por receptores específicos que inducen la respiración y la síntesis de enzimas hidrolíticas (Bangerth, 2000; Rahemi & Ramezani, 2007). De esta manera, el etileno estimula la caída de flores y frutos. Por lo tanto la abscisión es un proceso reprimido por auxinas y activado por etileno. La polinización, la fecundación y el posterior desarrollo de semillas conducen a una mayor actividad hormonal en el ovario y los pequeños frutos, reduciendo el riesgo de caer (Wertheim, 2000).

Los raleadores de flores pueden presentar dos mecanismos de acción: los raleadores cáusticos se basan en el quemado de órganos femeninos de las flores (estigmas o estilos), por lo cual previenen la germinación del polen, su crecimiento a través del estilo y la posterior fecundación; en tanto que otros compuestos incrementan la liberación de etileno por parte de la flor (Wertheim, 2000, Fallahi & Willemsem, 2002; Webster, 2002). La temperatura, la humedad relativa, la concentración del producto, el cultivar y el porcentaje de flores abiertas en el momento de la aplicación son factores importantes para determinar la eficacia de los raleadores de flores (Williams, 1994; Wertheim, 2000, Fallahi & Willemsem, 2002; Stover & Greene, 2005). Los raleadores de flores son más efectivos a mayores concentraciones, temperatura o humedad relativa.

La urea suele ser citada como un raleador cáustico debido a que se suele observar cierto grado de quemado en flores, hojas y brotes, días después de la aplicación de urea en altas concentraciones (Zilkah *et al.*, 1988; Link, 2000, Wertheim, 2000; Schröder & Link, 2002). Sin embargo, no pueden descartarse otros mecanismos de acción. De hecho, Schröder (2001) en su tesis de doctorado demostró que la urea disminuye la exportación de auxinas del fruto del manzano (citado de Schröder & Link, 2002). Además no siempre se observa este quemado (Basak, 1993).

En 1991, Handschack & Alexander evaluaron el efecto de la aplicación de urea al 6% sobre la emisión de etileno de flores y hojas de dardos de manzanos. A las 24 horas de la aplicación de urea, tanto las flores como las hojas de los dardos presentaron un aumento significativo en la emisión de etileno (entre 200 y 300 %). A las 72 horas, este incremento ya no era significativo (Handschack & Alexander, 2002). Este pico de etileno sin duda juega un papel preponderante en el raleo generado por la aplicación de urea.

Handschack & Alexander (2002) proponen como causa del pico de liberación de etileno al quemado de flores y hojas. Acorde con esto, encontraron que el efecto raleador se correlacionaba bien con el grado de quemado de las flores y las hojas. No obstante, otro factor involucrado en la liberación de etileno podría ser la disminución en el transporte de auxinas del fruto encontrada por Schröder (2001).

2.2 Efecto del raleo sobre el tamaño de los frutos

Sin duda el raleo de frutos es una de las técnicas más importante en la producción de fruta para aumentar la calidad de la producción. Una mayor intensidad de raleo mejora las características cualitativas del fruto más importantes para el mercado, tales como el tamaño y el color de la fruta (Link, 2000).

El **peso medio del fruto** se correlaciona negativamente con la carga del cultivo. La regresión se mostró lineal en el rango de tamaños de fruto de interés para los productores. Los coeficientes de correlación encontrados se situaron entre -0,36 y -0,83. Los árboles pequeños presentaron coeficientes más altos y significativos que los árboles grandes. El incremento en el peso medio del fruto es máximo (+ 30 %) cuando el raleo se realizaba al inicio de la estación de crecimiento (yema rosada y plena floración) respecto al raleo más tardío (luego de *June Drop* o “caída de noviembre”, pico máximo de la caída fisiológica de frutos) (Link, 2000).

La **distribución de los frutos según su tamaño** se corresponde con una curva de distribución normal. Los tratamientos de raleo efectivos trasladan la curva desde los tamaños pequeños a tamaños superiores. El raleo puede arrojar menores kilos de frutos pequeños y mayores kilos de frutos grandes (Link, 2000). Como por los frutos grandes se obtienen mayores precios, el beneficio económico se acentúa (Dennis, 2000). El rendimiento de frutos medianos y pequeños se incrementa exponencialmente con la carga frutal (Fig. 2.1). En tanto que el rendimiento de frutos grandes se manifiesta como una curva de óptimo: tanto una carga elevada como un sobreraleo pueden reducir la cantidad de frutos grandes debajo del valor potencial. La eficiencia del raleo puede ser evaluada mediante este valor: el rendimiento máximo de frutos grandes logrado en el árbol. Esta herramienta es interesante ya que una de las mayores dificultades del raleo es encontrar la intensidad de raleo óptima (Link, 2000).

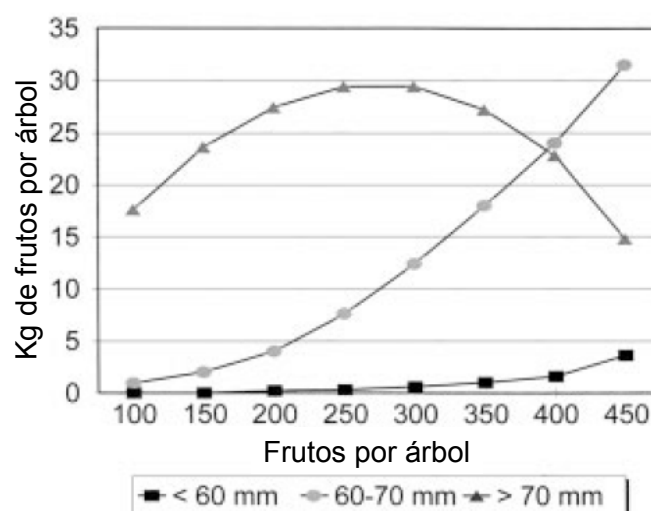


Figura 2.1. Rendimiento de manzano cv. Elstar (1650 árboles por ha) en 3 categorías de tamaño en relación con la carga frutal (frutos por árbol). Datos de 90 árboles en 1997. Extraído de Link (2000).

Cuando se realizan ensayos de raleo de un solo año, se puede concluir erróneamente que es posible lograr hasta el doble de producción de frutos grandes, dependiendo del cultivar y la intensidad de raleo. En realidad, en ensayos de varios años en las mismas plantas, lo que se puede observar es una mayor regularidad en la producción y un incremento en la cantidad de frutos medianos y grandes de alrededor del 10 % (Link, 2000).

A medida que un fruto presenta un mayor número de semillas, su peso en la cosecha suele ser mayor. Al parecer el efecto de las semillas es mayor sobre el diámetro que sobre el largo del fruto. De todas maneras esta correlación puede presentar excepciones como el caso de frutos con tendencia partenocárpica (Denne, 1963). La pera *Williams* es un fruto de estas características (Benitez, 2001). En estos frutos, por el contrario un gran número de semillas puede deprimir el crecimiento del fruto por un efecto competitivo (Denne, 1963).

2.2.1 Efecto de la urea sobre el tamaño de los frutos

Zilkah *et al.* (1988) encontraron en la cosecha, aumentos de entre 10 y 20 % en el peso de duraznos y nectarines debido a la aplicación de urea al 8-12 % en plena floración. Un mayor tamaño en los frutos podía observarse ya a los pocos días luego de la aplicación. Los autores consideran que estos aumentos se deben principalmente al raleo logrado por estas pulverizaciones.

En la comercialización del pistacho, el número de nueces por onza (28g) es un factor importante. Rahemi & Ramezani (2007) encontraron que la aplicación de urea al 5% 10 DDPF aumentó el tamaño de los frutos, expresado como una disminución del 20 % en el número de nueces por onza.

Handsack & Alexander (2002) mencionan que la urea al 3-8% claramente promueve el tamaño de los frutos en manzano a pesar de su limitado efecto raleador. En ensayos realizados durante cuatro años, la urea incrementó el tamaño de los frutos en 35%. En concordancia, Schröder & Link (2002) encontraron que la urea al 4% incrementó el peso de las manzanas en la cosecha entre un 10 y 40 % aplicado en caída de pétalos o yema hinchada respectivamente.

La aplicación de urea (5-7,5%) sobre perales cuando el 80 % de las flores estaban abiertas (plena floración) incrementó el peso medio de las peras en la cosecha entre un 10 y un 30 % e incrementó la proporción de frutos de tamaño superior (Sánchez *et al.*, 2007).

2.3 El raleo y las células en el fruto

2.3.1 Importancia del número de células del fruto

Inmediatamente luego de la floración el crecimiento del fruto es lento, este periodo transcurre entre la polinización y la fecundación, y puede durar de 2 a 12 días en manzano. Después de la fecundación, comienza una fase de crecimiento rápido de tipo exponencial. Posteriormente la tasa de crecimiento decrece hasta la cosecha, generando una curva de crecimiento de tipo sigmoideo. Este tipo de curva es característico en manzana y pera (Denne, 1963, Sozzi, 2007).

Ciertamente la división celular durante los primeros estadios de desarrollo del fruto determina en gran medida el tamaño final de los frutos (Westwood, 1993; Goffinet *et al.*, 1995). Después de la polinización comienza un periodo de división celular en los pequeños frutos que, en la pera cv. *Williams*, puede durar entre 4 y 8 semanas. (Sozzi, 2007). La tasa máxima de división celular en manzanas ocurre alrededor de dos semanas después de la floración (Bergh, 1990; citado de Goffinet *et al.*, 1995). Generalmente el número de células en peras y manzanas queda determinado en los primeros 35-60 DDPF (Denne, 1960, Westwood, 1982).

Uno de los factores más importantes que controlan la división celular es la cantidad de reservas que proviene de la temporada anterior. Así, una gran cosecha en la temporada anterior puede reducir el número de células y por lo tanto el tamaño final del fruto (Goffinet *et al.*, 1995).

La expansión celular comienza poco después de la fecundación y continúa a través del periodo de división celular (Denne, 1963). Una vez concluida la fase de división celular, el incremento en el tamaño del fruto depende de la expansión de las células (Harada *et al.*, 2005). Sin embargo la división celular parece ser más importante que la expansión celular en la determinación del tamaño final del fruto en perales (Zhang *et al.*, 2006).

El tamaño final del fruto puede ser visto como el resultado del número de células y el tamaño celular (Westwood *et al.*, 1967). El número de células en un fruto puede verse incrementado por una mayor tasa de división celular en la fase de división celular del crecimiento del fruto, por la prolongación de este periodo o por la combinación de ambos fenómenos (Wismer *et al.* 1995). El peso de fruto se correlaciona estrechamente con el número de células del fruto ($r=0,40-0,97$) y con el tamaño celular ($r=0,80-0,97$). (Link, 2000)

El número y el tamaño de las células de un fruto no sólo son importantes como factores primordiales del tamaño del mismo, sino que además pueden afectar otros atributos de calidad de los frutos, tal como han demostrado Mann *et al.* (2005) evaluando diez genotipos distintos de manzana. Los autores encontraron que el número de células en el fruto era importante para un atributo sensorial como la crocantes de la manzana, los frutos con menos células eran más crocantes. Por otra parte, las manzanas con células más voluminosas tendían a ser más jugosas.

2.3.2 Diferente metodología para determinar parámetros celulares

Los primeros trabajos que estudian parámetros celulares en frutos se realizaron en manzana. Posteriormente la metodología descrita en manzanas comenzó a utilizarse en peras. El primer trabajo del que se tiene referencia corresponde al año 1960, en Inglaterra. En este trabajo, Denne mide el diámetro de la manzana y de su corazón (cavidad de las semillas) y contabiliza el número de células que atraviesan la pulpa. Luego estima el diámetro celular medio.

- Diámetro celular medio (mm) = $\frac{\text{Ancho de la pulpa del fruto (mm)}}{\text{Nº de células que atraviesan la pulpa}}$

Posteriormente calcula el volumen de la manzana y las células tomando como base sus diámetros y asumiendo que se tratan de esferas (Volumen de esfera = $\frac{4}{3} * \pi * \text{radio}^3$). Por último la autora obtiene un indicador aproximativo del número de células en el fruto mediante el siguiente cálculo:

- Número de células en el fruto = $\frac{\text{Volumen del fruto (mm}^3\text{)}}{\text{Volumen celular medio (mm}^3\text{)}}$

En 1967, Westwood *et al.* realizan dos modificaciones a esta metodología. En primera instancia mejoran la exactitud en la determinación del volumen del fruto gracias al dato de gravedad específica previamente determinado para distintas variedades a lo largo de la temporada (Westwood, 1962).

- Volumen del fruto (cm³) = $\frac{\text{Peso del fruto (g)}}{\text{Gravedad específica (g/cm}^3\text{)}}$

Por otra parte los autores determinan que la forma de las células en las manzanas se asemeja más a un esferoide que a una esfera. Por esta razón, consideran necesario determinar tanto el diámetro mayor como el diámetro menor de las células.

- Volumen celular medio (μm³) = $\frac{4}{3} \pi a(\mu\text{m}).b(\mu\text{m})^2$
Donde a: ½ Diámetro mayor medio y b: ½ Diámetro menor medio

En 1995, Wismer *et al.* desarrollan una metodología nueva para manzanas inspirándose en los procedimientos de Denne (1960). Esta metodología toma el *diámetro celular medio* como indicador del tamaño celular, y al *número de capas* como indicador del número de células del fruto. La técnica se basa en contar el número de células a lo largo del ancho de la corteza del fruto (línea radial entre un haz vascular y la epidermis). Posteriormente estima el diámetro celular medio como la división del ancho de la corteza del fruto por el número de células contabilizado. Esta metodología luego fue aplicada en peras cv. *Spadona* (Flaishman *et al.*, 2005 y Shargal *et al.*, 2006).

Zhang *et al.* (2005) realizó su tesis de doctorado estudiando distintos factores que afectan la división y expansión celular en peras japonesas (*Pyrus pyrifolia* Nakai) tales como la partición de los ¹³C-fotosintatos desde las hojas del dardo y las giberelinas. El autor presenta una larga trayectoria evaluando parámetros celulares en peras. (Zhang *et al.*, 2005^a, 2005^b, Zhang *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2008). La metodología que implementa es similar a la desarrollada por Wismer *et al.* (1995) y toma los mismos indicadores. La diferencia radica en que este autor mide longitud celular media y luego estima el número de capas:

- N° de capas en el mesocarpo = $\frac{\text{Ancho del mesocarpo } (\mu\text{m})}{\text{Longitud celular media } (\mu\text{m})}$

2.3.3 Efecto del raleo sobre las células del fruto

El raleo puede modificar el crecimiento del fruto mediante el estímulo de la división celular (tasa o duración), el incremento del alargamiento celular, un mayor espacio intercelular o la combinación de estos procesos (Goffinet *et al.*, 1995).

Cuando el raleo se realiza al inicio de la temporada (previo o hasta una semana luego de la floración), los frutos que permanecen en el árbol tienen la ventaja de continuar la división celular en ausencia de frutos competidores cercanos (Goffinet *et al.*, 1995). Así, el raleo temprano usualmente estimula la división celular (Westwood *et al.*, 1967). Los árboles raleados cerca de la floración producen frutos más grandes debido especialmente a un mayor número de células en el fruto (Denne, 1960; Westwood *et al.*, 1967; Nelgen, 1982, Goffinet *et al.*, 1995). Westwood *et al.* (1967) encontraron entre 15 y 20 % más de células en manzanas *Red Delicious* provenientes de árboles raleados en floración.

En manzanos cv. *Empire*, Goffinet *et al.* (1995) estudiaron distintos momentos de raleo manual: yema rosada (YR), plena floración (PF), 10, 20 y 40 DDPF. El mayor incremento en el tamaño de la manzana se manifiesta cuando el raleo manual se realiza cerca de plena floración (YR, PF o 10 DDPF); estos frutos presentaban alrededor de 50 millones de células. Mientras más tarde se realizó el raleo manual, menor fue el tamaño del fruto y el número de células presente. Los frutos provenientes de plantas raleadas más tardíamente (40 DDPF) presentaban 44 millones de células y los frutos provenientes de plantas no raleadas presentaban 32 millones de células.

El número de células presenta una alta relación cuadrática con el peso de la manzana cv. *Empire* (Fig. 2.2.). Lo que esta curva manifiesta es que existe un límite en la contribución de la división celular al incremento del tamaño del fruto, ya que el peso de los frutos tendían hacia una asíntota superior (220-230g) aún cuando el número de células puede continuar incrementándose.

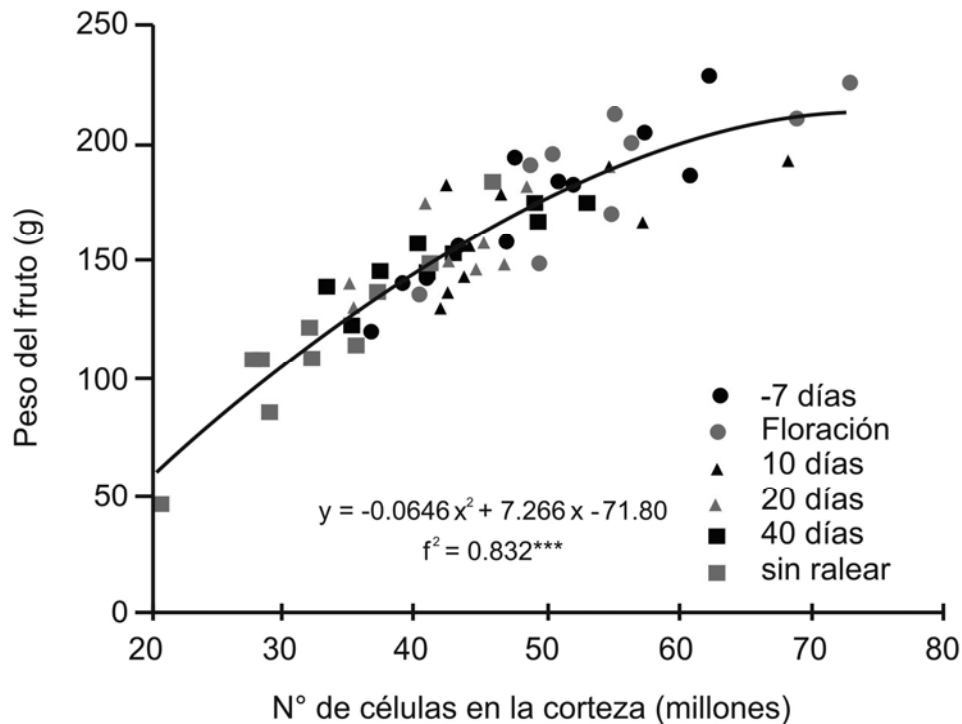


Figura 2.2. Regresión cuadrática del peso del fruto respecto al número de células en la corteza para 60 manzanas Empire en la cosecha. Diez frutos por tratamientos fueron muestreados a lo largo del rango de tamaños de fruto de los árboles raleados manualmente en varias fechas relativas con plena floración o árboles sin ralear. Extraído de Goffinet et al. (1995).

Westwood *et al.* (1967) estudiaron el efecto de un raleador de floración (DNOC) sobre el número y tamaño de las células del fruto en manzanas cv. *Red Delicious* y cv. *Golden delicious*. Las manzanas cv *Red Delicious* provenientes de plantas pulverizadas con DNOC eran 12 % más grandes y presentaban un volumen celular algo mayor (7%) que las manzanas provenientes de plantas testigos. Los manzanos cv. *Golden Delicious* presentaban una mayor carga y el efecto del raleo fue más marcado, los frutos provenientes de plantas raleadas eran 44 % más grandes y presentaban entre 24 y 33 % más de células.

Los raleadores químicos de frutos tales como en Ácido Naftalen Acético (ANA) y el Carbaril suelen aplicarse entre 14 y 21 DDPF. Con estos productos, la disminución de la competencia entre los frutos remanentes en el árbol se logra hacia el final de la fase de división celular. Por lo tanto, el incremento en el tamaño de los frutos en la cosecha debería estar basado en un mayor volumen celular. Estos resultados fueron encontrados por Wismer *et al.* (1995) en manzanas “*Empire*” con incrementos entre 8 y 9 % en el diámetro celular medio. Un resultado diferente hallaron Westwood et al., (1967) quienes encontraron que los frutos provenientes de manzanos cv. *Golden delicious* raleados químicamente tenían entre 14 y 20 % más de células; por lo cual concluyen que si bien estos raleadores no pueden modificar el número de células presente en el fruto, tienen una acción extremadamente selectiva, haciendo caer a los pequeños frutos que cuentan con un menor número de células.

Una mención especial merece la aplicación de citocininas sobre manzanos y perales al inicio del crecimiento de los frutos. Las citocininas son hormonas vegetales que promueven la división celular en tejidos vegetales. Entre las citocininas evaluadas se encuentra la Benciladenina (BA) y dos citocininas sintéticas (CPPU y TDZ). La aplicación de citocininas 14 DDPF aumenta el tamaño de los frutos en la cosecha, incrementa el número de células presente en el fruto, y de manera relacionada disminuye el volumen celular. Shargal *et al.* (2006) mencionan que las peras cv. *Spadona* aplicadas con citocininas sintéticas presentaban sobre su radio entre 35 y 45 % más de células con un diámetro 12% menor. Wismer *et al.* (1995) encontraron que las manzanas cv. *Empire* aplicadas con BA tenían 20 % más de capas de células con un diámetro 6% menor. La BA también se ha manifestado efectiva para ralear perales, cuando es aplicada en concentraciones entre 100 y 150 ppm, entre dos y tres semanas después de la floración (Bound & Mitchell, 2000; Bertelsen, 2002; Stern & Flaishman, 2003). Las citocininas presentaron diferentes mecanismos para lograr este mayor número de células: la BA incrementó la tasa de división celular en manzanas pero no influenció la duración de este proceso, en tanto que las citocininas sintéticas prolongaron el periodo de división celular de las peras hasta los 55 DDPF, alrededor de 20 días más que los frutos testigos.

2.4 Nitrógeno

2.4.1 Ciclo de nitrógeno dentro del árbol

El nitrógeno (N) forma parte de las proteínas, los ácidos nucleicos y otros componentes celulares importantes, incluyendo la clorofila y las hormonas vegetales (Williams & Miller, 2001). El N es transportado en forma de aminoácidos, vía xilema hacia las hojas, y vía floema hacia otros órganos demandantes (Williams & Miller, 2001). El reciclaje interno de N es una estrategia importante desarrollada por las plantas perennes para desacoplar los procesos de crecimiento de los momentos de absorción de N por parte de las raíces. Gracias a la removilización de la reserva, los árboles caducifolios pueden reanudar su crecimiento vegetativo y reproductivo en los primeros días de la primavera, aún en ausencia (o muy baja) absorción radical de N. Al inicio de la primavera, la baja temperatura del suelo representa una condición sub-óptima para la absorción radical, además disminuye fuertemente la tasa de mineralización de la materia orgánica lo cual genera bajos niveles de nutrientes en el suelo (Millard, 1996; Tagliavini *et al.*, 1997; Tagliavini & Millard, 2005; Corelli Grappadelli *et al.*, 2007).

En el ciclo del N existe una analogía con el carbono, cuya disponibilidad al inicio de la estación vegetativa proviene de las reservas acumuladas en forma de almidón y no depende (al menos totalmente) de la baja actividad fotosintética de las pequeñas hojas en desarrollo (Corelli Grappadelli *et al.*, 2007).

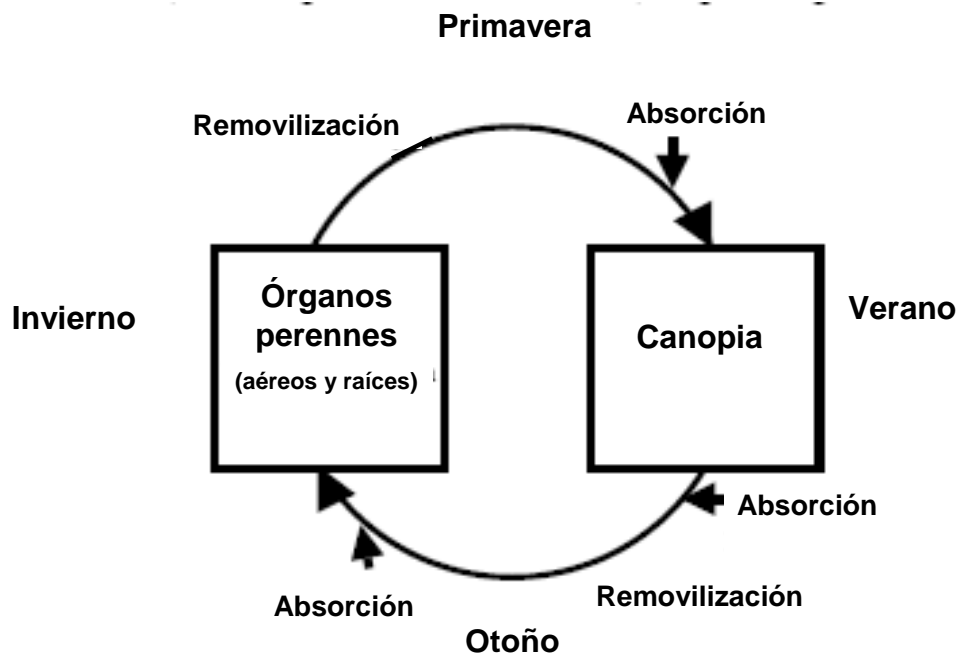


Figura 2.3. Los patrones temporales en el ciclo de N entre años en árboles caducifolios mostrando flujos y almacenamiento de N. Extraído de Millard (1996).

2.4.1.1 Almacenamiento invernal del nitrógeno

Son dos los mecanismos que contribuyen a la formación de reservas nitrogenadas. La principal fuente es la removilización de N proveniente de las hojas senescentes, pero también participa el N absorbido en el otoño, el cual es asignado directamente a las reservas (Sánchez *et al.* 1990^a, 1991; Tagliavini *et al.*, 1999) (Fig. 2.3).

En el otoño, durante la senescencia foliar, las proteínas de la hoja son degradadas y el N es transportado y almacenado en órganos leñosos de la planta (Cheng *et al.*, 2004). La habilidad de diferentes especies en recuperar el N de las hojas durante la senescencia varía entre 20 % y 80 % dependiendo también de las condiciones ambientales (Millard, 1996). Se calcula que la cantidad de N removilizado de las hojas puede alcanzar 20-30 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Tagliavini & Millard, 2005). Si la concentración de N en la hoja es relativamente alta, es probable que una menor proporción de N logre ser removilizada (Tagliavini & Millard, 2005).

El N absorbido por las raíces en el otoño es alojado directamente en el sistema radical para su almacenamiento en plantas de perales (Sánchez *et al.*, 1990^b, 1991) y durazneros (Tagliavini *et al.* 1998, 1999).

Los árboles caducifolios almacenan el N en la corteza de las ramas, del tronco y en el sistema radical (Tagliavini *et al.*, 1998; Tagliavini & Millard, 2005). En los órganos aéreos, el N es almacenado principalmente en forma de proteínas específicas de reserva (Cheng *et al.*, 2004); mientras que en las raíces, las cuales no sufren una verdadera y propia quiescencia invernal, el N se acumula en forma de aminoácidos libres, especialmente arginina, o proteínas ricas en arginina. (Tagliavini & Millard, 2005; Corelli Grappadelli *et al.*, 2007). La síntesis de proteínas de reserva es desencadenada por la disminución de las horas de luz y es estimulada en presencia de una adecuada disponibilidad de nitrógeno (Corelli Grappadelli *et al.*, 2007)

Los árboles jóvenes tienen una limitada capacidad de acumulación y removilización y se caracterizan por un crecimiento anual elevado en relación a la biomasa del esqueleto, basándose especialmente en la absorción de nutrientes. Con el correr de los años, el aumento de dimensión del esqueleto incrementa a su vez su capacidad de acumulación de N (Corelli Grappadelli *et al.*, 2007).

2.4.1.2 Removilización primaveral del nitrógeno

En la primavera, la removilización del N acumulado en el invierno representa la principal fuente de N en árboles adultos y se inicia previo al inicio de absorción de N por parte de las raíces (Sánchez *et al.*, 1990^b, 1991; Tagliavini *et al.*, 1997, 1998; Tagliavini & Millard, 2005). El N almacenado en órganos aéreos es removilizado hacia los órganos en desarrollo antes que el N almacenado en el sistema radical (Tagliavini *et al.*, 1998).

La duración de la removilización de N depende de la cantidad de N almacenada en el invierno y no está influenciada por la cantidad de absorción primaveral (Guak *et al.*, 2003; Tagliavini & Millard, 2005; Corelli Grappadelli *et al.*, 2007). En abedules, cerezos y manzanos, la removilización está prácticamente terminada a los 40 días luego de la brotación (Millard *et al.* 1998; Grassi *et al.*, 2002, Guak *et al.*, 2003) pero puede llegar a durar más de 60 días si los árboles tienen suficiente N almacenado (Tagliavini & Millard, 2005). En perales, Tagliavini *et al.* (1997) encuentran que la removilización estaba prácticamente concluida para el momento del cuaje. El aporte del N removilizado fue de 1 -1,5 mg por hoja y entre 2,5 - 3 mg por fruto.

La removilización del N almacenado suele proveer gran parte de N utilizado para el crecimiento del año. La contribución del N removilizado al N total del nuevo crecimiento es variable (Tagliavini & Millard, 2005), en perales cv Abbé Fetel esta provisión puede alcanzar el 50 % del N total de la canopia (Quartieri *et al.*, 2002)

En la primavera, la floración y los primeros estadios vegetativos de los perales dependen casi exclusivamente del N almacenado y la absorción radical de N recién es importante a partir del crecimiento activo de los brotes (Sánchez *et al.*, 1990^b, 1991). En perales cv *Abbé Fetel* en plena floración, el 90 % del N en las flores proviene del almacenamiento y el desarrollo temprano de los pequeños frutos se basa en el N removilizado de la reserva. Para el momento de plena floración la mayor parte del N presente en hojas de peral también deriva de la removilización de N (Tagliavini *et al.*, 1997). Luego de caída de pétalos, la absorción radical se incrementa progresivamente y comienza a enviar N a las hojas, proporcionando cerca del 46% del nitrógeno total, convirtiéndose en una importante fuente de N para el crecimiento de los brotes (Tagliavini *et al.*, 1997). Por su parte, Sánchez *et al.* (1990^b, 1991) encontraron una menor recuperación del N aplicado en primavera sobre perales cv. *Comice*.

A diferencia del peral, las hojas de dardo de manzano alcanzan su desarrollo máximo muy rápidamente, por lo cual utilizan prácticamente el N removilizado en exclusividad. Nielsen *et al.* (1997) mencionan que el 80 % del N utilizado para el crecimiento de las hojas del dardo en manzano proviene de las reservas.

La medición de la capacidad de almacenamiento y removilización de N de un árbol es dificultosa y gran parte del conocimiento deriva del uso del isótopo estable ¹⁵N y el posterior muestreo destructivo del árbol entero (Millard, 1996). Estos estudios suelen estar restringidos a pequeños árboles cultivados en macetas con arena o hidroponia (Millard, 1996). Una alternativa para estudiar la removilización de N sobre árboles adultos en el campo se basa en el flujo de N en la savia xilemática durante la brotación. Para su determinación se deben integrar mediciones de flujo xilemático con la concentración de los compuestos nitrogenados presentes. En manzano se han identificado los principales compuestos translocados en la savia xilemática: Asparragina, glutamina y ácido aspártico (Malaguti *et al.* 2001; Guak *et al.* 2003).

2.4.2 Aplicación foliar de urea

La nutrición de las plantas a través de los órganos aéreos es considerada una técnica para suministrar nutrientes rápidamente al órgano destino. Esta técnica puede ser útil cuando el suelo presenta condiciones limitantes para la disponibilidad y absorción de nutrientes (baja temperatura, humedad o aireación) (Tagliavini & Toselli, 2004). La función específica de la hoja es la producción de carbohidratos pero gracias a sus características anatómicas presenta condiciones ventajosas para la incorporación inmediata de los nutrientes a los fotosintatos, y el transporte de estos a los lugares de la planta con mayor demanda (Trinidad-Santos & Aguilar-Manjarez, 1999).

Para que el nutriente sea absorbido foliarmente, el mismo debe atravesar la cutícula de la hoja. La composición de la cutícula varía según la especie. La cantidad de ceras que poseen las hojas de una especie determinada, se correlaciona con la capacidad de absorber nutrientes. Entre los frutales de hoja caduca, los manzanos son los que mejor responden a la fertilización foliar. Las hojas de peral presentan mayor contenido de ceras que las del manzano, por lo que absorción es más limitada (Sánchez, 1999).

Existen tres tipos de factores que afectan la eficiencia en una fertilización foliar: 1- de la técnica de aplicación (volumen y concentración de la solución aplicada, pH de la solución y adición de surfactantes o tensioactivos), 2- de las condiciones ambientales en el momento de aplicación (temperatura, luz, humedad relativa, viento, hora del día) y 3- del cultivo (especie, edad de las hojas, cantidad de follaje en el momento de aplicación) (Sanchez, 1999; Trinidad-Santos & Aguilar-Manjarez, 1999).

La urea es el fertilizante más ampliamente utilizado en la producción agrícola mundial debido a su bajo costo, facilidad de manipulación, estabilidad química y elevado contenido nitrogenado (46%) (Sirko & Brodzik, 2000; Wang W. *et al.*, 2008). La urea es extremadamente soluble y puede ser aplicada de manera foliar, facilitando el manejo nitrogenado y minimizando las pérdidas de N al medioambiente (Witte *et al.*, 2002; Wang W. *et al.*, 2008). La concentración de urea en la solución depende del tipo de cultivo al que se aplica; en frutales 0,6-1,0 %, en hortalizas 0,5- 3,0% y en cereales 0,5-10,0% (Trinidad-Santos & Aguilar- Manjarez, 1999). Tagliavini & Toselli (2004) mencionan un rango más amplio de concentraciones para plantas frutales, entre 0,2 y 4 %. En post de mejorar la absorción de urea en las hojas, el pH de la solución debe ser ligeramente ácido: 5,4-6,6 (Tagliavini & Toselli, 2004; Wójcik, 2004). Por otra parte la absorción foliar de urea en manzanos y porotos (*Phaseolus vulgaris* L.) está relacionada positivamente con la intensidad de luz (Wójcik, 2004).

En la mayoría de los cultivos, la absorción foliar de urea es mayor y más rápida que la de otras formas inorgánicas de N (Witte *et al.*, 2002; Wójcik, 2004; Wang W. *et al.*, 2008). Este fenómeno está relacionado con el hecho que la cutícula es entre 10 y 20 más permeable a la urea que a los iones inorgánicos (Wójcik, 2004). Incluso la urea incrementa la permeabilidad de la cutícula facilitando la penetración de otros nutrientes (Sánchez, 1999). Furuya & Umemiya (2002) estudiaron la absorción de varios fertilizantes nitrogenados en duraznero, entre los cuales se encontraba la urea. Los autores encontraron que la máxima absorción de los fertilizantes ocurrió a los 3 días después de la aplicación (DDA). A los 70 DDA, la urea fue el fertilizante con mayor grado de absorción (87,7%) y cada hoja presentaba en promedio 0,224 mg de nitrógeno absorbido.

En la mayoría de las plantas, la urea absorbida es hidrolizada en el citosol. El NH_3 liberado puede ser asimilado o también puede pasar al apoplasto. La volatilización de NH_3 es la principal causa de la frecuente baja recuperación de N proveniente del fertilizante (30-70%), luego de la aplicación foliar de urea (Witte *et al.*, 2002).

La fertilización nitrogenada aplicada luego de la cosecha es efectiva para incrementar las reservas nitrogenadas en los tejidos perennes (Quartieri *et al.*, 2002). En perales, las aplicaciones poscosecha vía suelo destinan principalmente el N al sistema radical (Sánchez *et al.*, 1991) mientras que muy poca cantidad de N aplicado en el suelo es detectado en las yemas florales (Sánchez & Righetti, 1990). En poscosecha también se puede pulverizar urea en concentraciones entre 2 y 10 % sobre las hojas (Sánchez *et al.*, 1990^a). Estas aplicaciones permiten aumentar el N almacenado en la parte aérea de la planta (Sánchez *et al.*, 1991; Tagliavini *et al.*, 1999; Tagliavini & Millard, 2005) y removilizarlo más rápidamente en la floración (Sánchez, 1999).

En la primavera, cuando la canopia del árbol se encuentra desarrollada, la fertilización nitrogenada aplicada foliarmente sobre perales no puede exceder una concentración de 0,5% (Sánchez *et al.*, 1990^a). Sin embargo cuando se aplican altas concentraciones de urea en la floración, las concentraciones minerales en hojas y frutos pueden incrementarse, tanto en duraznos y nectarines, como en pistachos y manzanos (Zilkah *et al.*, 1988; Handschack & Alexander, 2002; Rahemi & Ramezani, 2007).

Zilkah *et al.* (1987) estudiaron la translocación de ^{15}N -urea en destinos vegetativos y reproductivos en palto (*Persea americana* Mill). La aplicación de urea al 2% incrementó el peso seco de las inflorescencias laterales y su concentración en ^{15}N . Las inflorescencias terminales pulverizadas con urea al 6% presentaban 2,55% de Nitrógeno, respecto a 1,89% de N de inflorescencias terminales testigos. Alrededor del 21 % de ese N provenía de la urea aplicada. Similares cantidades de ^{15}N fueron translocadas a los frutos en desarrollo y a las nuevas hojas.

Un mes después la aplicación foliar de ^{15}N -urea al 2% luego de la floración sobre manzanos cv *Fuji*, las hojas aplicadas presentaban 10 % de nitrógeno proveniente del fertilizante (NPF) (Fallahi *et al.*, 2002). Handschack & Alexander (2002) encontraron que manzanos pulverizados con urea al 6% al inicio de la floración presentaban un mayor contenido de nitrógeno en hojas en Agosto (Hemisferio Norte).

2.4.3 La urea dentro de la célula vegetal

La urea se encuentra por doquier en la naturaleza, donde es una fuente de nitrógeno rápidamente disponible para el crecimiento de varios organismos, incluyendo bacterias, hongos y plantas. La principal fuente de urea en la naturaleza son la descomposición de compuestos nitrogenados de organismos muertos y la excreción de orina de parte de los animales. La urea es rápidamente degradada por enzimas presentes en los organismos y liberadas en el suelo. Por lo tanto la concentración de urea en ambientes naturales es baja y en suelos agrícolas no suele superar 70 μM . La urea en el suelo se descompone rápidamente en amonio (NH_4^+), el cual puede ser absorbido por las raíces, nitrificado o fijado en el suelo (Wang W. *et al.*, 2008).

En fertilizaciones vía suelo, no ingresan grandes cantidades de urea en la planta; sin embargo en pulverizaciones foliar muchos estudios fisiológicos sostienen que la molécula de urea ingresa entera en las células vegetales (Wang W. *et al.*, 2008). El nitrógeno proveniente de la urea absorbida por la hoja debe ser metabolizado en los tejidos de las plantas antes de ser utilizado. Este metabolismo involucra varias reacciones tales como la hidrólisis de la urea y la incorporación del amoníaco/amonio a los aminoácidos (Wójcik, 2004).

En las células vegetales, la urea es un importante intermediario del metabolismo, producto del catabolismo del N (Wang W. *et al.*, 2008). (Fig.2.4). Una de las principales fuentes de urea es la degradación de la arginina (Arg) en el mitocondrias (Fig.2.4). En las plantas la Arg es un importante compuesto utilizado para el transporte y almacenamiento de N y está ligada con la degradación de proteínas (Sirko & Brodzik, 2000; Witte *et al.*, 2002; Follmer, 2008; Wang W. *et al.*, 2008). El catabolismo de la Arg también está fuertemente conectado al metabolismo de las poliaminas. La urea es un subproducto de la síntesis de poliaminas. La agmatina es sintetizada a partir de la arginina y luego es hidrolizada por la agmatinasa para formar putrescina y urea (Wang W. *et al.*, 2008). (Fig. 2.4)

En algunas plantas, la urea también puede ser generada por el catabolismo de las ureidas (especialmente alantoina y alantoato) (Sirko & Brodzik, 2000; Witte *et al.*, 2002; Follmer, 2008; Wang W. *et al.*, 2008) (Fig.2.4). Las ureidas provienen de las purinas, originadas de la degradación de ácidos nucleicos tales como el ADN (Ácido Desoxirribo Nucleico) y ARN (Ácido Ribo Nucleico). En algunas especies las ureidas representan una importante forma de transporte del N.

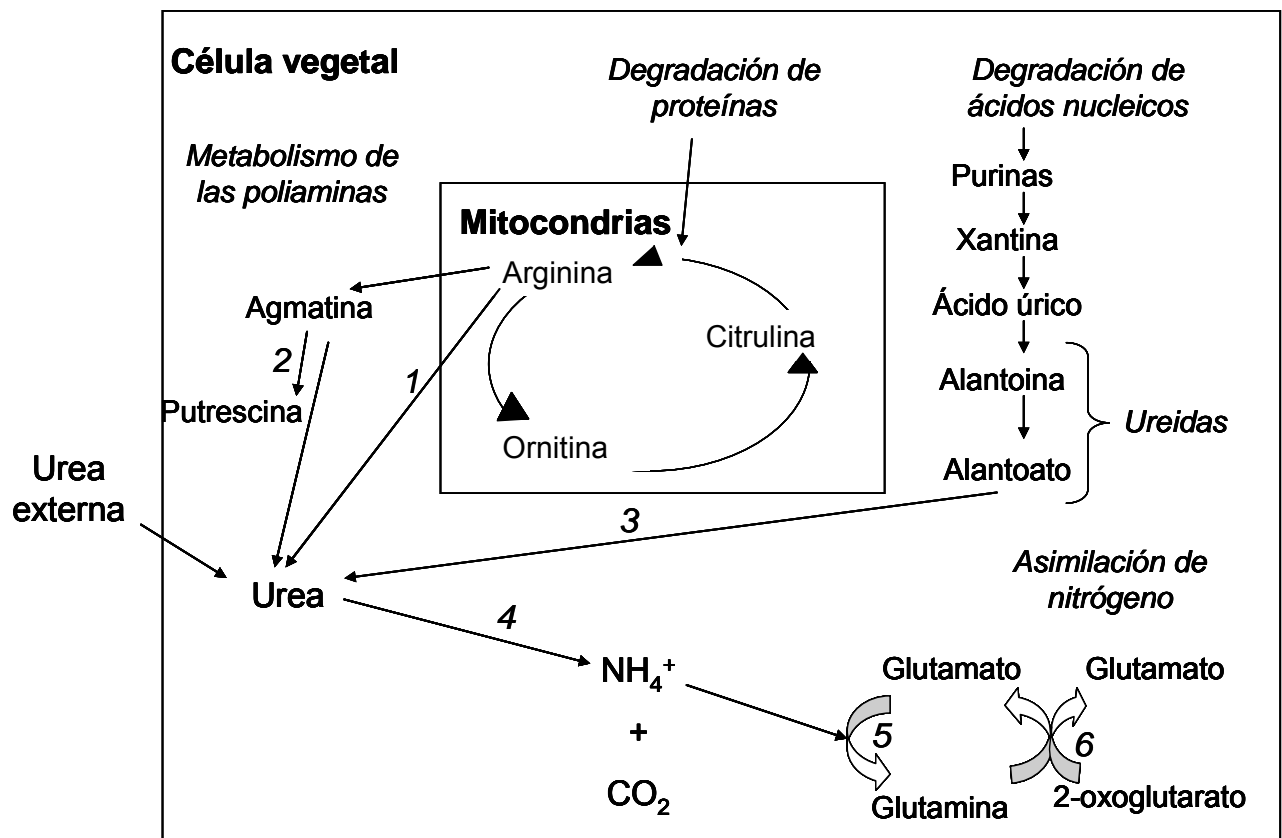


Figura 2.4. Esquema simplificado mostrando la generación, transporte y degradación de urea en células vegetales. Las enzimas generadoras de urea son: (1) arginasa, (2) agmatinasa y (3) amidinohidrolasas. La urea citosólica puede ser hidrolizada por la (4) ureasa a amonio, el cual luego es asimilado por la (5) glutamintasintetasa, complementada con la (6) glutamato sintetasa. Modificado de Wang W. et al. (2008).

Un importante rol fisiológico de la urea en el metabolismo del N se manifiesta en procesos tales como la germinación de semillas y la senescencia de las hojas, en los cuales ciertos tejidos denominados “fuentes” remobilizan N para localizarlo en otros destinos. En estos tejidos, la degradación de macromoléculas contenedoras de N (tales como las proteínas y los nucleótidos), proporciona grandes cantidades de urea, como fuente de N (Witte *et al.*, 2002; Wang W. *et al.*, 2008).

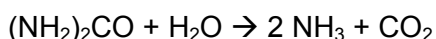
En la senescencia de las hojas ocurre un cambio metabólico importante: la asimilación de carbono es reemplazada por el catabolismo de la clorofila y otras macromoléculas tales como proteínas y ARN (Lim *et al.*, 2007) El primer cambio significativo en la estructura de la célula es la degradación de los cloroplastos, organelas que contienen más del 70 % de la proteína de la hoja (Lim *et al.*, 2007). La mayor parte del N en las hojas se encuentra incorporada en proteínas. En plantas C3 la más abundante es la enzima RUBISCO (Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/ oxigenasa), la cual representa más del 90 % de la proteínas solubles en hojas de manzano (Millard, 1993).

2.4.4 Enzima ureasa

En las plantas superiores, el N presente en la urea no está disponible sino hasta que es hidrolizado por la ureasa (Sirko & Brodzik, 2000; Follmer, 2008). El rol primario de la ureasa es permitir a los organismos utilizar la urea generada externa o internamente como recurso nitrogenado. Cualquier modificación que permita incrementar la actividad ureasa puede resultar en una asimilación más efectiva de este fertilizante (Sirko & Brodzik, 2000).

Muchos organismos, incluyendo las plantas, los hongos y algunas bacterias, sintetizan ureasa (Sirko & Brodzik, 2000; Wang W. *et al.*, 2008; Follmer, 2008). La ureasa es una enzima citosólica y puede ser encontrada en todos los tejidos de las plantas por lo que se la considera ubicua (Sirko & Brodzik, 2000; Witte *et al.*, 2002).

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea para formar carbamato y amoníaco (NH_3). El carbamato es inestable y termina formando otra molécula de NH_3 y dióxido de carbono (CO_2). (Witte *et al.*, 2002). En definitiva, la hidrólisis de la urea en el citosol libera dióxido de carbono y amoníaco (Bibby & Hukins, 1992; Sirko & Brodzik, 2000; Wang W. *et al.*, 2008; Follmer, 2008)



En pH neutro, la mayor parte de NH_3 se convierte en amonio ($\text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$) (Witte *et al.*, 2002), el cual entonces es asimilado (Wang W. *et al.*, 2008)

La enzima ureasa presenta dos iones de níquel (Ni) en su sitio activo. Es por esto que el níquel es considerado un nutriente esencial en las plantas, lo cual refleja la importancia de esta enzima para el metabolismo. Las plantas que crecen sin Ni no muestran actividad ureasa, por lo cual acumulan grandes cantidades de urea y presentan reducidas concentraciones de aminoácidos tales como la glutamina (Gln) y asparagina (Asn). Estas plantas son deficientes en N, tienen una apariencia clorótica y presentan una pobre producción de materia seca (Gerendás & Sattelmacher, 1997^a). La deficiencia en Ni afecta fuertemente a las plantas cuya fuente de N es la urea (Gerendás & Sattelmacher, 1997^b, 1999; Gerendás *et al.*, 1998).

2.4.5 Asimilación del amonio en aminoácidos

En las plantas todo el nitrógeno inorgánico es reducido a amonio antes de ser incorporado en una forma orgánica (Lam *et al.*, 1996). El amonio es un producto tóxico en el citoplasma, por lo tanto es inmediatamente incorporado a una molécula orgánica (Britto & Kronzucker, 2002). En el citosol, el NH_4^+ se encuentra en concentraciones dentro del rango milimolar (Britto *et al.*, 2001).

En la raíz, el NH_4^+ puede provenir de la absorción, de la reducción de los nitratos o de la degradación de proteínas de reserva. Normalmente la asimilación del amonio ocurre en la propia raíz (Williams & Miller, 2001) y los aminoácidos sintetizados son conducidos por el xilema a la parte aérea donde son requeridos en los puntos de crecimiento para la síntesis de proteínas (Lam *et al.*, 1996). Pero también el NH_4^+ puede ser transportado hacia las hojas (Nielsen & Schjoerring, 1998).

En la hoja, además del NH_4^+ ingresado, grandes cantidades son constantemente generadas por la fotorespiración (Lam *et al.*, 1996; Nielsen & Schjoerring, 1998). En plantas C3, la cantidad de amonio liberado a través de la fotorespiración puede llegar a ser 10 veces más importante que el amonio proveniente de la asimilación primaria; por lo tanto, para sobrevivir, una planta debe poder reasimilar este amonio fotorespiratorio (Lam *et al.*, 1996).

Las principales enzimas vinculadas con la asimilación del NH_4^+ son la glutamino sintetasa (GS) y la glutamato sintetasa (GOGAT) (Lam *et al.*, 1996; Sirko & Brodzik, 2000; Wang W. *et al.*, 2008)

La GS cataliza la síntesis de glutamina (Gln) a partir de glutamato (Glu) y amonio (Lam *et al.*, 1996). Esta enzima presenta una alta afinidad con el NH_4^+ , lo cual se refleja en su bajo valor de K_m (10-20 μM) (Britto *et al.*, 2001). El K_m es la concentración del sustrato que permite a la enzima trabajar a la mitad de su velocidad máxima. La GS puede encontrarse en el citosol o en el cloroplasto (Lam *et al.*, 1996). La GS cloroplástica tiene por función la reasimilación del amonio proveniente de la fotorespiración en la mitocondria (Lam *et al.*, 1996; Nielsen & Schjoerring, 1998).

La GOGAT cataliza la formación de 2 moléculas de glutamato a partir de glutamina y 2-oxoglutarato. En las raíces se encuentra la NADH-GOGAT, en tanto que en los cloroplastos de la hoja, se encuentra la Ferredoxin-GOGAT, que cuenta con la particularidad de ser inducida por la luz (Lam *et al.*, 1996).

Como en todo proceso de reducción, en estas dos reacciones es necesaria una fuente de energía química. Cuando el proceso ocurre en las hojas, la energía de muy bajo costo proviene de la reacción lumínica de la fotosíntesis. En cambio cuando el proceso se localiza en la raíz, la energía en forma de ATP proviene de la respiración de las mitocondrias (Heldt, 2005). Estos dos aminoácidos (Gln y Glu) operan como moléculas transportadoras de nitrógeno y pueden actuar como dadores de nitrógeno en muchas reacciones celulares, tal como la síntesis de asparagina (Asn), otro aminoácido comúnmente presente en la reserva o movilización del N. La asparagina se forma a partir de la glutamina y el ácido aspártico, liberando glutamato (Lam *et al.*, 1996).

2.5 Efecto tóxico de la urea en la planta. Implicancia del estrés oxidativo

2.5.1 Necrosis por aplicación foliar de urea

En aplicaciones de raleadores caústicos, como la urea, la concentración de la solución es crucial, ya que estos productos suelen ser fitotóxicos (Dennis, 2000). Cuando se acumulan altas concentraciones de urea en las hojas, se manifiesta un efecto tóxico y se observa una necrosis en la punta de las hojas (Krogmeier *et al.*, 1989).

En durazneros y nectarines, la urea en altas concentraciones (8-12 %) no resultó fitotóxica para las hojas nuevas. Sin embargo, dosis excesivas de urea (12-16%) causaron el decaimiento de brotes y el desecamiento de pequeñas ramitas (Zilkah *et al.*, 1988). En duraznero, la aplicación de urea es más segura que en manzano, ya que en el momento de la floración los durazneros presentan menos follaje (Dennis, 2000).

En manzanos, se observan severas necrosis en las hojas días después de aplicar urea (4-8%) (Link, 2000; Wertheim, 2000). Schröder & Link (2002), encontraron que la aplicación de urea al 4% dañó entre el 8 y el 22 % del área foliar las hojas. En perales, la aplicación de urea (5-10%) en poscosecha causó necrosis en los márgenes de las hojas (Sánchez *et al.*, 1990^a). En plena floración, la aplicación de urea (5-7,5%) generó cierto grado de quemadura sobre los pétalos de las flores pero no manifestó ningún efecto visible sobre las hojas de perales.

2.5.2 Toxicidad por amonio

Cuando se realiza una pulverización de urea sobre las hojas de una planta, la misma es degradada por la enzima ureasa generando amoníaco (NH_3) y dióxido de carbono (CO_2). Inmediatamente, el amoníaco se carga positivamente, convirtiéndose en amonio (NH_4^+). El mismo pasa a formar parte de algún aminoácido, para integrar posteriormente una proteína. Cuando la solución de urea es muy concentrada, la planta no logra incorporarlo a los aminoácidos con la suficiente rapidez y se acumulan grandes cantidades de amonio en la hoja. El amonio es un nutriente paradójico, a pesar de ser el intermediario en muchas reacciones metabólicas y una fuente nitrogenada cuyo estado oxidativo no necesita reducción en la célula vegetal; puede generar síntomas de toxicidad. Tal efecto ha sido observado en prácticamente todas las plantas cuando son cultivadas con NH_4^+ como único recurso nitrogenado (Britto & Krozucker, 2002). La mayoría de los estudios se basan en la toxicidad generada por NH_4^+ suministrado en las raíces, pero por lo general, bajo esta condición se encuentran concentraciones citosólicas de NH_4^+ mayores a las habituales. La concentración citosólica de NH_4^+ se encuentra en el rango bajo o medio milimolar (Britto & Krozucker, 2002).

A pesar de que los mecanismos que subyacen a la toxicidad debida al NH_4^+ han sido extensamente buscados, no se ha logrado comprender los eventos primarios a nivel celular. Se han postulado varias hipótesis para explicar por qué el NH_4^+ es tóxico para las plantas (Britto *et al.*, 2001^a) pero los mecanismos moleculares y bioquímicos de la fitotoxicidad todavía necesitan ser dilucidados (Wang W. *et al.*, 2008).

Dado que la absorción radical de NH_4^+ está acoplada con la expulsión de H^+ a la rizósfera, repetidas veces se ha sugerido a la acidificación del medio radical cómo el causante de los síntomas observados. Sin embargo, a menudo la toxicidad sigue manifestándose aún en soluciones con pH controlado, por lo cual otros factores deben estar actuando (Britto *et al.*, 2001^a; Britto & Krozucker, 2002).

También se menciona el disturbio del pH intracelular como una explicación al respecto, ya que la incorporación de NH_4^+ en las proteínas también libera H^+ ; pero en un análisis más completo, en el que se incluya la absorción y la asimilación, se concluye que la célula vegetal experimenta la aparición intracelular de 4 moles de H^+ por mol de N, sin importar que este N sea suministrado como NH_4^+ o NO_3^- , por lo cual ésta no podría ser la razón (Britto & Krozucker, 2002).

Otros autores han sugerido que una privación local de carbohidratos en las hojas puede contribuir al síndrome sintomático, debido a que la mayoría de las plantas asimila el nitrógeno en la raíz y requiere una provisión de esqueletos carbonados (Zhu *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001^a).

Las plantas cultivadas en base a NH_4^+ presentan en sus tejidos una disminución esencial de cationes tales como K^+ , Mg^{+2} y Ca^{+2} . Esta disminución está acompañada con incrementos en los niveles de aniones inorgánicos tales como los cloruros, sulfatos y fosfatos. Esto puede contribuir al síndrome tóxico por amonio (Britto *et al.*, 2001^a; Britto & Krozucker, 2002; Wang C. *et al.*, 2008). Otras modificaciones en la composición celular incluyen una mayor concentración de aminoácidos libres y poliaminas (Britto & Krozucker, 2002; Wang C. *et al.*, 2008).

Es notorio que la toxicidad al amonio es más pronunciada ante altas intensidades lumínicas por lo cual el efecto del amonio sobre la fotosíntesis reviste especial interés. La conexión entre la supresión de crecimiento inducida por NH_4^+ ante altas intensidades de luz y un daño en los centros fotosintéticos ha sido planteada por Britto & Krozucker (2002). Se ha demostrado que es falso que la toxicidad debida al NH_4^+ resulta del desacople de la fotofosforilación de la fotosíntesis en los cloroplastos, una de las primeras hipótesis mencionadas (Zhu *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001^a).

Las plantas expuestas a niveles altos de amonio a menudo presentan una menor fijación de CO_2 (Britto & Krozucker, 2002). Esta disminución en la fotosíntesis neta puede deberse a un incremento en la fotorespiración (Zhu *et al.*, 2000) o a una menor capacidad para sintetizar pigmentos como la clorofila, debido al déficit de Mg^{+2} (Wang C. *et al.*, 2008).

La fotoreducción rápida del carotenoide violaxantina a su forma reducida zeaxantina bajo condiciones de alta intensidad de luz, disipa la energía lumínica en forma térmica. Así, la zeaxantina cumple un rol fotoprotector del fotosistema II del aparato fotosintético (Lichtenthaler, 1998). La conversión de violaxantina a zeaxantina, fue mucho mayor en hojas de plantas de poroto crecidas en base a NO_3^- que las de hojas de plantas crecidas en base a NH_4^+ (Zhu *et al.*, 2000; Bendixen *et al.*, 2001). La oxidación no enzimática de zeaxantina a violaxantina puede estar ocasionada por el oxígeno singulete, una especie reactiva del oxígeno (Lichtenthaler, 1998).

Drath *et al.* (2008) trabajando en una cianobacteria (*Synechocystis*), encontraron que el amonio acelera la fotodestrucción del fotosistema II. Los autores se inclinan a pensar que si bien el trabajo fue realizado en una bacteria, es probable que este fenómeno pueda ser generalizado para todos los organismos fotosintéticos aeróbicos.

Zhu *et al.* (2000) estudiaron las diferencias en la tolerancia al estrés lumínico de plantas de poroto según el tipo de suministro nitrogenado: NO_3^- o NH_4^+ . Las plantas crecidas en base a NH_4^+ , presentaban concentraciones incrementadas de NH_4^+ en sus hojas. Bajo altas intensidades de luz, estas plantas utilizan vías metabólicas que conducen a una **mayor producción de especies reactivas del oxígeno (EAO)**. Una consecuencia importante de esta mayor producción de EAO, es la peroxidación de lípidos. Bajo un estrés lumínico, las hojas con mayor contenido de NH_4^+ presentaron una mayor peroxidación de lípidos desde el inicio del tratamiento. Luego de siete días, la peroxidación de lípidos decreció gradualmente hasta el nivel del control, debido probablemente a incrementos en los mecanismos de defensa antioxidante.

Wang C. *et al.* (2008), trabajando en una planta acuática perenne distribuida extensamente en China, encontraron que **el amoníaco induce la generación de EAO**. Las EAO pueden afectar el sistema fotosintético de las plantas, causando daños en la membrana y la estructura del cloroplasto. A pesar de estos antecedentes, la implicancia de las EAO durante el estrés producido por amonio todavía no ha sido bien caracterizada (Domínguez-Valdivia *et al.*, 2008).

2.5.3 Especies reactivas del oxígeno

Cuando las formas de oxígeno están incompletamente reducidas, son llamadas especies reactivas del oxígeno (EAO) (Smirnoff, 1993; Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002). La producción de las EAO es una consecuencia inevitable del metabolismo aeróbico (Mittler, 2002; Asada, 2006). Las EAO son extremadamente reactivas y oxidan todo tipo de componentes celulares, proteínas, lípidos y ADN; afectando componentes claves del metabolismo celular de la planta (Davies, 1987; Smirnoff, 1995; Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002; Møller *et al.*, 2007; Luna *et al.*, 2006). La respuesta de la planta depende de la concentración y el sitio de producción de las EAO (Møller *et al.*, 2007).

En el metabolismo normal de la planta, la fotosíntesis y la respiración son fuentes de EAO (Mittler, 2002). En los tejidos no verdes o en la oscuridad, la respiración en el mitocondrias parece ser la principal productora de EAO (Møller *et al.*, 2007) en tanto que en los tejidos verdes expuestos a la luz, los cloroplastos y los peroxisomas (por la fotorespiración) son los principales productores de EAO (Asada, 2006; Møller *et al.*, 2007). Las diferentes EAO presentan propiedades muy distintas (Møller *et al.*, 2007).

A pesar de su carácter radical, la molécula de oxígeno es estable y moderadamente agresiva (Ballester, 1996). El oxígeno atmosférico es relativamente poco reactivo, pero puede transformarse en formas más reactivas, tales como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, las cuales pueden causar daños al ambiente celular (Sminorff, 1993).

El radical anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) tiene una vida media de 2 a 4 μs (Dat *et al.*, 2000). El superóxido en sí mismo no es altamente reactivo y produce el daño mediante la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Sminorff, 1993). El H_2O_2 es una molécula relativamente estable y afín al agua (Ballester, 1996). Su vida media es relativamente larga (1 ms) (Dat *et al.*, 2000) y una de sus principales fuentes es la fotorespiración (Luna *et al.* 2005).

La reacción del radical anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, para formar el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) es muy lenta y lleva el nombre de Haber Weiss (Sminorff, 1993; Inzé & Van Montangu, 1995). En presencia de Hierro (Fe), Cobre (Cu) u otros metales de transición, esta reacción se cataliza y cobra el nombre de reacción de Fenton (Sminorff, 1993; Dat *et al.*, 2000; Møller *et al.*, 2007). Por esto, un mecanismo para limitar la formación de HO^{\bullet} es mantener extremadamente baja la concentración de iones metálicos (Møller *et al.*, 2007).

El radical hidroxilo (HO^{\bullet}) es extremadamente tóxico (Ballester, 1996), tiene una vida media muy corta, menor a 1 μs , y se encuentra en muy bajas concentraciones (Dat *et al.*, 2000; Møller *et al.* 2007). El HO^{\bullet} reacciona rápidamente con todo tipo de componentes celulares (proteínas, lípidos y ADN) en su sitio de producción (Inzé & Van Montangu, 1995; Dat *et al.*, 2000; Møller *et al.*, 2007). Debido a su semejanza fisicoquímica con el agua y a su pequeñez, lo que facilita su penetración en las membranas celulares, el HO^{\bullet} ataca a las proteínas y los lípidos presentes en ellas y produce efectos devastadores (Ballester, 1996).

Si bien las EAO son normalmente formadas en el metabolismo de las células, su regulación es un evento común y esencial para la supervivencia de la planta (Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002; Møller *et al.*, 2007). Las células de todos los organismos aeróbicos tienen muchos mecanismos para remover estas EAO antes de que produzcan daño (Sminorff, 1993, Mittler, 2002). El balance entre la producción de EAO y la actividad de los sistemas removedores va a determinar el tipo y la concentración de EAO presente y el daño ocasionado (Møller *et al.*, 2007). El estrés puede alterar la homeostasis celular e incrementar la producción de EAO (Mittler, 2002). El daño oxidativo está frecuentemente asociado con el estrés biótico y abiótico (Luna *et al.* 1994; Smirnovff, 1998, Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004).

Las células vegetales contienen una serie de mecanismos de protección enzimáticos y no enzimáticos que eliminan eficientemente las EAO y minimizan la ocurrencia de daño oxidativo bajo circunstancias normales (Sminorff, 1993; Inzé & Van Montagu, 1995; Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002; Møller *et al.*, 2007). El principal mecanismo de protección es la acción de las enzimas: superóxido-dismutasa, ascorbato-peroxidasa y catalasa (Mittler, 2002). Entre los mecanismos de protección no enzimáticos se encuentran metabolitos hidrosolubles: Ácido ascórbico y glutatión; y liposolubles: carotenoides y α -tocoferol, los cuales se presentan en altas concentraciones en las plantas (Inzé & Van Montagu, 1995; Mittler, 2002). Los radicales hidroxilos son demasiado reactivos para ser eliminados enzimáticamente pero su formación se encuentra limitada por la eliminación de sus precursores (Inzé & Van Montagu, 1995).

2.5.4 Daño oxidativo

Los síntomas de daño oxidativo no son fáciles de medir, incluyen peroxidación de lípidos, particularmente de membranas celulares, desnaturalización de proteínas y daño a los ácidos nucleicos (Smirnovff, 1993; Ballester, 1996). Tradicionalmente la peroxidación de lípidos es considerada como el principal daño debido a las EAO y además, es el más frecuentemente medido (Smirnovff, 1993; Rikans & Hornbrook, 1997; Luna *et al.*, 2000^b; Del Rio *et al.* 2005).

Los ácidos grasos poliinsaturados son los más susceptibles a la peroxidación (Smirnovff, 1993). En las membranas, los principales ácidos grasos poliinsaturados son el ácido Linoleico (18:2) y el ácido Linolenico (18:3) (Møller *et al.*, 2007). Su peroxidación disminuye la fluidez y selectividad de la membrana (Luna *et al.*, 2000^b; Møller *et al.*, 2007). Los aldehídos son los principales productos de la oxidación de los lípidos (Smirnovff, 1993; Del Rio *et al.*, 2005). Los principales aldehídos formados son el HNE (4-hydroxy 2 nonenal) proveniente del ácido linoleico y el MDA (malón di aldehído) proveniente del ácido linolenico (Møller *et al.*, 2007).

El MDA es el principal producto final de bajo peso molecular y ha sido extensamente utilizado desde el año 1950 para estimar la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados de membranas celulares en una amplia variedad de vegetales, entre los que se puede mencionar plantas acuáticas (Wang C. *et al.*, 2008), plantas de poroto (Zhu *et al.*, 2000), trigo (Luna *et al.*, 1997; Luna *et al.* 2000^a) y soja (Luna *et al.*, 2006), arbustos (Munné-Bosch & Alegre, 2002), arándanos (Taulavuori *et al.*, 2001), árboles caducifolios (García-Plazaola *et al.*, 2003), cítricos (Arbona *et al.*, 2008) e incluso perales (Predieri *et al.*, 1995). Si bien la determinación de MDA se ha convertido en el sistema elegido como indicador general de peroxidación de lípidos (Hodges *et al.*, 1999; Del Rio *et al.*, 2005), éste aldehído solo puede ser formado por ácidos grasos con 3 o más enlaces dobles y dado que los tejidos vegetales a menudo contienen niveles altos de ácido linoleico, el MDA puede subestimar la cantidad de peroxidación total (Griffiths *et al.*, 2000). De todas maneras, la cuantificación del MDA puede ser una herramienta útil cuando nuestro objetivo no es cuantificar la cantidad total de peroxidación, sino evaluar si determinada situación genera un estrés oxidativo en términos relativos.

En 1968, Heath & Packer desarrollaron una técnica para cuantificar el MDA basada en su reacción con el ácido tío-barbitúrico (TBA) para formar un producto fluorescente rojo en condiciones de pH bajo y altas temperaturas. Este producto presenta un pico máximo de absorción de luz en 532 nm de longitud de onda, donde su coeficiente de extinción molar es de $1,55 \cdot 10^5$ moles /litro. Ésta técnica ha sido reconocida por su simplicidad, sensibilidad, economía y rapidez, convirtiéndose en un clásico que continúa en vigencia.

En 1992, Du & Bramlage alertaron que esta técnica puede sobreestimar el contenido de MDA, debido a que el TBA puede reaccionar con la sacarosa a 37 °C para formar un compuesto que presenta una absorbancia máxima a 440 nm. En base a mediciones en manzanas, tomates y pimientos los autores concluyen que la interferencia debida a azúcares (sacarosa y fructosa), no es despreciable ya que, si bien generan una interferencia sumamente baja a 532 nm, su concentración en los tejidos vegetales es marcadamente mayor a la del MDA (1-10 mM vs. 0,75-5 µM). Por tal motivo, los autores incluyen una medición a 440 nm en el espectrofotómetro para poder determinar la interferencia debida a azúcares.

En 1999, Hodges *et al.* advierten que las antocianinas contribuyen a la absorbancia a 532 nm. De hecho, la diferencia entre la absorbancia a 536 y 600 nm es un método común para cuantificar en contenido de antocianinas. Sumado a esto, los tejidos de plantas expuestas a estrés ambiental acumulan estas sustancias, las cuales pueden no ser visibles a simple vista. En base a estudios en materiales ricos en pigmentos, principalmente antocianinas, tales como la remolacha, el arándano, la berenjena, el tomate, el rabanito, la espinaca y la lechuga, los autores proponen realizar dos soluciones con el extracto del tejido, una con el agregado de TBA y otra sin TBA (denominada control) para poder discernir la interferencia generada por las antocianinas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de trabajo

Los ensayos se llevaron a cabo en dos montes frutales ubicados en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Alto Valle en Contralmirante Guerrico, provincia de Río Negro (39° 01' de latitud Sur y 67° 40' de longitud Oeste, 242 msnm) durante las temporadas 2006/2007, 2007/2008 y 2008/2009.

De acuerdo con *Thorntwait*, la región del Alto Valle se caracteriza por tener un clima árido a semiárido, mesotermal y con lluvias deficientes durante todo el año. En la clasificación de *Köppen*, la zona está dentro de la región climática Bwk: clima seco, desértico fresco (Rodríguez & Muñoz, 2006).

La región se caracteriza por tener altos valores de radiación global. El fotoperiodo tiene su valor máximo en diciembre con 15,9 horas y disminuye paulatinamente hasta junio, acusando un valor de 10,4 horas. La zona se caracteriza por tener una temperatura media anual de 15 °C. El mes más caluroso es enero, con temperaturas medias de 24 °C y máximas medias de 31 °C. Durante el mes de julio la temperatura media es de 6,6 °C con una máxima media de 13 °C. La marcada amplitud térmica media de 17°C es propia del carácter continental de la región. La fecha media de ocurrencia de la primer helada es el 14 de abril y, la de la última helada, el 3 de octubre. El periodo medio libre de heladas es de 190 días. La necesidad de frío invernal de los frutales de hoja caduca es normalmente satisfecha, alcanzando valores superiores a las 1.200 horas. El proceso de evaporación fue marcado en el mes de enero con valores medios de 7 mm por día. Al año, la pérdida de agua por evaporación alcanza un total de aproximadamente 1.400 mm. Sin embargo la precipitación media anual es de tan solo 244 mm. La humedad relativa anual media es de 65%. El viento adquiere importancia en la zona principalmente de octubre a diciembre, cuando ocurre la mayor frecuencia de vientos fuertes, superiores a 40 km/h. El viento se presenta todo el año, adquiriendo velocidades medias entre 5 y 9 km/hora, la dirección predominante es del oeste y suroeste, frío y seco (Rodríguez & Muñoz, 2006).

El tipo de suelo corresponde a un Halacuepte fluvéntico que presenta un horizonte A de aproximadamente 20 cm de espesor, textura franca, estructurado en bloques, de pH neutro a ligeramente alcalino. Es un suelo moderadamente bien drenado y presenta un bajo contenido de materia orgánica (1,34%) y una salinidad entre 0,3-0,6 mS/cm (CFI, 2008).

3.2 Material vegetal

Las principales características de las parcelas se detallan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Principales características de las parcelas frutales empleadas.

Parcela	Variedad/ Portainjerto	Año de plantación	Marco de plantación	Sistema de conducción	Tipo de riego	Protección antihelada
5N1	Williams/ Franco	1975	4 x 4 m	Espaldera Orientación Este-Oeste	Manto	Calefactores
5N4	Williams/ Franco	1993	4 x 3 m	Espaldera Orientación Este-Oeste	Micro aspersión	Aspersión

En ambas parcelas, además de filas de perales de cv. *Williams* en las cuales se realizaron las experiencias, hay filas intercaladas de perales cv. *Packhams Triumph* y cv. *Berreu D'anjou*. En el cuadro 5N1 se realizó un riego cada 15 días comenzando, en cada temporada, en el mes de septiembre y finalizando en el mes de marzo, contabilizando en total 14 riegos en toda la temporada. En el caso del cuadro 5N4 el riego se efectuó en función de la evaporación del tanque tipo A con un Kc que varió a lo largo del ciclo del cultivo entre 0,6 y 1,2.

Para determinar el estado nutricional de las plantas del ensayo se tomaron muestras foliares a principios de Febrero y se enviaron a laboratorios especializados para determinar la concentración de nutrientes (Los resultados se presentan en el anexo). En cuanto al manejo sanitario de los cuadros, se siguieron los tratamientos de acuerdo al plan de manejo de plagas y enfermedades que se llevan a cabo en los montes comerciales.

3.3 Diseño experimental y tratamientos

Se realizaron tres ensayos para dar respuesta a los 5 objetivos específicos.

Para **los primeros 3 objetivos**, se realizó el ensayo en el cuadro 5N1 por tres temporadas. En la última temporada se decidió realizarlo también en el cuadro 5N4. En el cuadro 5N1, se seleccionaron 10 filas distanciadas al menos 30 metros de las cortinas forestales para evitar cualquier tipo de competencia que pudieran ejercer las barreras rompevientos. En el cuadro 5N4 se utilizaron 3 filas. Los árboles del cuadro 5N1, de más de 30 años, presentaron una variabilidad elevada. Por tal motivo, dentro de cada hilera se seleccionaron plantas similares respecto al tamaño y la densidad floral.

En la tabla 3.2 se presenta el área seccional de tronco promedio y el número de ramilletes promedio de los árboles incluidos en el ensayo en cada temporada y su coeficiente de variación. Los tratamientos se distribuyeron al azar entre las plantas seleccionadas.

Tabla 3.2. Área seccional de tronco y número de ramilletes florales promedio por árbol de las plantas evaluadas en los ensayos

Cuadro	Temporada	Área seccional de tronco (cm ²)		Nº de ramilletes florales por árbol	
		Promedio	CV	Promedio	CV
5N1	2006-2007	232,9	26 %	132,7	28 %
	2007-2008	204,7	24 %	319,9	23 %
	2008-2009	247,0	26 %	406,4	20 %
5N4	2008-2009	125,1	24 %	181,2	18 %

CV: Coeficiente de Varianza

El diseño experimental empleado fue completamente aleatorizado con 10 repeticiones por tratamiento. El tratamiento fue la aplicación foliar de urea en la floración. Las aplicaciones se realizaron cuando los árboles se encontraban en plena floración (80 % de flores abiertas) (Fleckinger, 1965) con una pulverizadora hidráulica de 500 L, la cual cuenta con una lanza para aplicaciones dirigidas. Se realizó una pulverización pareja sobre ambas caras de toda la planta hasta alcanzar el punto de goteo. Las concentraciones, fechas, horas y condiciones ambientales en el momento de la aplicación se detallan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Características ambientales de los momentos en que se realizaron las pulverizaciones foliares de urea sobre perales cv . Williams

Cuadro	Concentración (% p/v)	Fecha	Horario	Temperatura ambiental	Humedad Relativa	Velocidad del viento
5N1	5 %	22/09/06	9:00-10:00	8-12 °C	50-60%	1,5-3 km/h
	5 %	03/10/07	13:00-15:00	23 °C	26 %	4 km/h
	7,5 %	25/09/08	8:30-9:00	9-12 °C	70-85 %	0-5 km/h
5N4	7,5 %	24/09/08	14:00-15:00	22 °C	23-28 %	2-5 km/h

En la primera temporada, se seleccionó al azar la mitad de las plantas de cada tratamiento y fueron raleadas manualmente entre el 15 y el 30 de Noviembre dejando los dos frutos más grandes en cada ramillete floral. Por lo cual en este caso en particular el diseño fue bifactorial con 5 repeticiones.

Para la evaluación nutricional, **objetivo específico 4**, se trabajó en el cuadro 5N4 con un diseño completamente aleatorizado con 6 repeticiones. Los tratamientos fueron: testigo y la pulverización con urea enriquecida (10 % de isótopo estable ^{15}N). En plena floración se marcaron 30 dardos en cada planta. Sobre estos dardos se pulverizó una solución de urea enriquecida con una concentración al 5 % en un volumen suficiente para mojar uniformemente todos los órganos del dardo (flores y primeras hojas). Posteriormente, se cubrieron estos dardos con bolsitas plásticas y se procedió a pulverizar toda la planta con urea convencional para evitar desequilibrios nutricionales dentro de las plantas. El ensayo se realizó en dos temporadas y las pulverizaciones fueron realizadas el 27/09/06 y el 24/09/08, respectivamente.

El daño oxidativo generado por la aplicación foliar de urea al 5% fue evaluado en dos momentos: primavera (plena floración) y finales del verano (poscosecha). Estos momentos de muestreo fueron seleccionados teniendo en cuenta que, mientras la aplicación foliar de urea al 5% realizada en plena floración no manifestó ningún efecto visible sobre las hojas, este mismo tratamiento realizado en poscosecha causó necrosis en los márgenes de las hojas (Sánchez *et al.*, 1990^a), sugiriendo alteraciones fisiológicas y metabólicas importantes en esta etapa. Para la evaluación del daño oxidativo, **objetivo específico 5**, se pulverizó urea al 5 % en estos momentos y se trabajó en el cuadro 5N4 con un diseño completamente aleatorizado con 6 repeticiones en dos temporadas: 2007-2008 y 2008-2009. Los tratamientos fueron: testigo y la aplicación foliar de urea al 5%. Las fechas de aplicación fueron 03/10/2007 y 24/09/2008 para la primavera; y 05/03/2008 y 04/03/2009 para fines del verano.

3.4 Variables respuestas

3.4.1 Carga frutal y caída de frutos

Para evaluar la carga frutal, se eligieron tres indicadores: el número de frutos cosechados por ramillete floral (cuaje), el número de frutos cosechados por área seccional de tronco (AST), también denominado carga frutal y la relación hoja/fruto. Estos indicadores son utilizados por los distintos autores (Westwood, 1982; Zilkah *et al.*, 1988; Goffinet *et al.*, 1995; Wismer *et al.*, 1995; Handschack & Alexander, 2002; Schröder & Link, 2002). El dato del número de frutos por árbol fue obtenido en la cosecha. En los primeros días de la floración se contó el número de ramilletes florales (corimbos) en cada árbol. También se midió el perímetro de los troncos a unos 20 cm sobre el nivel del suelo. En base al perímetro de los troncos, se calculó el AST.

$$\text{AST (cm}^2\text{)} = \frac{\text{perímetro}^2 \text{ (cm)}}{4 \cdot \pi}$$

En la temporada 2008/2009, además de estos indicadores se decidió incluir otros indicadores en base al número de frutos presente a los 45 DDPF en ramas marcadas. Para lo cual, en cada planta se seleccionaron dos ramas a las cuales se les contabilizó el número de ramilletes florales y se les determinó el Área Seccional de Rama (ASR).

A mediados de abril se cubrió cada árbol del ensayo en el cuadro 5N1 con una malla media-sombra cosida en sus bordes, para recolectar la totalidad de sus hojas. En el otoño, una vez que la caída natural de hojas hubo concluido, se pesó la totalidad de las hojas recolectada en cada árbol. Para cada árbol, en base a una submuestra de peso conocido, en la cual se contabilizó el número de hojas, se calculó el peso seco medio de una hoja. En base a este dato, se estimó el número de hojas en el árbol.

Nº de hojas del árbol = Peso seco de la totalidad de las hojas

Peso seco medio de hoja

La aplicación de urea foliar en floración generó la caída de frutos en los primeros 15 días en otras especies: pistachos, durazneros y nectarines (Zilkah *et al.*, 1988; Rahemi & Ramezani, 2007). Por esta razón, en la temporada 2008/2009 se decidió evaluar el patrón de caída de frutos desde la floración y a lo largo de toda la temporada.

Tanto en el cuadro 5N1 como en el 5N4, se marcaron 10 ramilletes florales en cada árbol del ensayo. Inicialmente, en cada corimbo se encontraban alrededor de 7 flores. Durante los dos primeros meses, se realizó un seguimiento semanal del número de frutos presente en cada dardo. Posteriormente, y debido al mínimo cambio ocurrido entre los últimos conteos, se decidió hacer un último conteo unos días antes de la cosecha (fines de diciembre). Luego, se calculó el número de frutos caídos en el dardo mediante la diferencia en el número de frutos entre dos fechas. La caída acumulada de frutos fue expresada en valores porcentuales tomando el número inicial de flores como 100 % (Gimenez *et al.*, 2008).

3.4.2 Producción y tamaño de frutos

Las cosechas se realizaron en la primera semana luego de la autorización oficial de la recolección (17/01/2007, 21/01/2008, 12/01/2009 5N1 y 19/01/2009 5N4) y se determinó el número de frutos y la producción por árbol. En base al perímetro de tronco medido en primavera se calculó la eficiencia productiva de cada árbol según Westwood (1982): producción del árbol (kg) / AST (cm²). Inmediatamente después de la cosecha se realizaron los análisis de los parámetros de madurez en el laboratorio de Poscosecha de la EEA Alto Valle con el objetivo de determinar el estado de la fruta. Por cada tratamiento las muestras consistieron en 40 frutos elegidos al azar. Se llevaron a la cámara frigorífica entre 2 y 4°C hasta el momento de realizar las determinaciones de: firmeza, sólidos solubles, acidez titulable y porcentaje de degradación de almidón. (Los datos se presentan en el anexo)

Como indicador del tamaño de los frutos se tomaron dos indicadores: peso medio y calibre medio de fruto. El primer indicador se obtiene dividiendo la producción del árbol (kg) por el número de frutos cosechados. El segundo indicador se estima en base al primero mediante la regresión desarrollada por Bramardi (1995).

$$\text{Calibre medio de fruto (mm)} = (\text{peso medio de fruto (g)} / 0,00153)^{1/2,772}$$

Posteriormente se procedió a realizar la clasificación de todos los frutos según su calibre para lo cual se utilizaron cajones tamañadores de 33 cm por 50 cm con cinco agujeros de distinto diámetro: 60, 65, 70, 75 y 80 mm. Los frutos fueron separados en 6 categorías de acuerdo a su tamaño: <60mm, 60-65mm, 65-70mm, 70-75mm, 75-80mm. y >80mm. Luego, el grupo de frutos en cada categoría fue contabilizado y pesado.

3.4.3 Número y tamaño de las células del fruto en la cosecha

Para evaluar la cantidad de células en el fruto se eligieron dos indicadores: el número de células (Denne, 1960) y el número de capas en el mesocarpo (Wisner *et al.*, 1995). Para evaluar el tamaño de las células también se seleccionaron dos indicadores: diámetro celular medio y el volumen celular (Westwood *et al.*, 1967).

Cada año, luego de tamañar los frutos de la cosecha del cuadro 5N1, se tomaron cinco frutos por árbol (50 por tratamiento) tratando de representar la distribución de tamaño de frutos tal como menciona Goffinet *et al.* (1995) y luego estos fueron llevados a una cámara frigorífica entre 2 y 4°C. Los autores mencionan un tamaño de muestra entre 5 (Wisner *et al.*, 1995), 10 (Goffinet *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2005^a) y 50 frutos (Westwood *et al.*, 1967). Luego de 7 días los frutos fueron pesados con una balanza analítica y se determinó su volumen mediante el cálculo propuesto por Westwood (1962), en base a la gravedad específica de la pera cv. Williams al momento de la cosecha (110 DDPF): 1,00 g/cm³.

- $$\text{Volumen del fruto (cm}^3\text{)} = \frac{\text{Peso del fruto (g)}}{\text{Gravedad específica (g/cm}^3\text{)}}$$

Posteriormente, se realizó un corte en la zona ecuatorial y se tomaron dos sectores, uno sobre el diámetro mayor y otro sobre el diámetro menor del fruto, tal como mencionan Westwood *et al.* (1967) y Goffinet *et al.* (1995). Los cortes fueron sumergidos en una solución de safranina al 0,5 % p/v para lograr la tinción de las paredes celulares y luego se procedió a realizar la técnica desarrollada por Sugiura *et al.* (1995) en Japón para medir el tamaño de las células en manzanas y peras.

Sugiura *et al.* (1995) desarrollaron esta novedosa metodología, inspirados en la *técnica basada en improntas* comúnmente utilizada para determinar el número de estomas en las hojas (Zelitch, 1961). Lo destacado de este procedimiento es que prescinde del proceso de fijación y el posterior seccionamiento del tejido por medio de un micrótopo. Se aplicó esmalte de uña sobre el corte teñido y, una vez seco, se retiró la lámina de esmalte con pinzas para ser observada bajo el microscopio ocular con un aumento de 10 X y de cada preparado se tomó una fotografía digital.

De cada fruto, se realizaron mediciones sobre el diámetro mayor y menor de 10 células mediante el programa de análisis de imágenes UTHSCSA *ImageTool* (desarrollado por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en San Antonio, Texas y disponible en Internet en (<http://maxrad6.uthscsa.edu>)).

Se calculó el volumen celular según Westwood *et al.* (1967).

$$\text{Volumen celular medio } (\mu\text{m}^3) = \frac{4}{3} \pi a b^2$$

Donde a: $\frac{1}{2}$ Diámetro mayor medio (μm)

b: $\frac{1}{2}$ Diámetro menor medio (μm)

Se calculó el número de células en el fruto según Denne (1960).

- Número de células en el fruto =
$$\frac{\text{Volumen del fruto (mm}^3\text{)}}{\text{Volumen celular medio (mm}^3\text{)}}$$

El diámetro celular medio fue calculado como el promedio entre el diámetro mayor y el diámetro menor. El ancho del mesocarpo se determinó restándole al diámetro del fruto, la longitud de su corazón (cavidad de las semillas, entre 15 y 25 mm) y dividiéndolo en dos. Se calculó el número de capas en el mesocarpo según Zhang *et al.* (2005^a).

- N° de capas en el mesocarpo =
$$\frac{\text{Ancho del mesocarpo } (\mu\text{m})}{\text{Diámetro celular medio } (\mu\text{m})}$$

En la última cosecha, en base a referencias que relacionaban el número de semillas y los parámetros celulares de los frutos (Denne, 1963; Zhang *et al.*, 2008), se decidió contar el número de semillas en los 100 frutos que se utilizaron como muestra para las determinaciones celulares. Para poder realizar un análisis más completo de la relación entre el número de semillas y el tamaño del fruto, además de estos 100 frutos, se tomaron otros 150 frutos como muestra y se les determinó el diámetro ecuatorial, el peso y luego de partirlos, el número de semillas.

3.4.4 Destinos y partición del nitrógeno proveniente del fertilizante

A principios de Febrero, se tomaron 40 hojas de cada árbol seleccionada en el cuadro 5N1, para realizar análisis foliar y determinar la concentración de nitrógeno. Las hojas fueron tomadas de la porción media de los brotes del año. Las hojas fueron lavadas con detergente no iónico y se enjuagaron dos veces con agua potable y una vez con agua destilada. Posteriormente las muestras fueron secadas en estufa a 70°C y enviadas a laboratorios especializados.

En el 2006, se realizaron 3 muestreos a los 2, 7 y 16 Días Después de la Aplicación (DDA) de urea enriquecida sobre dardos de plantas de cuadro 5N4. A los 12 DDA, el número de frutos de los dardos marcados fue contabilizado y luego se realizó un raleo manual, dejando 2 frutos en cada dardo. En 2008, se realizaron 2 muestreos a los 2 y 9 DDA.

En cada fecha, varios dardos reproductivos por árbol fueron muestreados (4 en 2006 y 6 en 2008) y se cuantificó el número de hojas y flores-frutos. Luego se determinó el peso fresco de estos órganos en balanza analítica. Se midió el área foliar (cm²) del conjunto de hojas del dardo utilizando el medidor de área foliar *Li-Cor Inc. Lincoln Nebraska USA Li 3100*. Una vez registrado el área foliar, todos los tejidos del dardo fueron colocados en bolsas de papel y se llevaron a estufa a 70 °C hasta peso constante. Una vez que se secaron los dardos, se procedió a registrar su peso seco (mg) y posteriormente se calculó el área específica (cm²/mg de peso seco). La estimación del área foliar, el peso fresco y seco por hoja fue hecha en base a las hojas completamente expandidas. Finalmente, cada tejido fue pulverizado por separado.

Las muestras, luego de ser molidas, fueron enviadas para analizar su concentración de N¹⁵ y N total. En base al peso seco determinado y el porcentaje de N total, se calculó el contenido de N (mg) presente en cada órgano. En base a la concentración de N¹⁵, se calculó el porcentaje de Nitrógeno Proveniente del Fertilizante (NPF) según MacKown *et al.* (1987).

$$\bullet \quad \text{NPF (\%)} = \frac{(N^{15}_{\text{tejido}} - N^{15}_{\text{abundancia natural}}) * 100}{(N^{15}_{\text{fertilizante}} - N^{15}_{\text{abundancia natural}})}$$

$$\text{Donde} \bullet \quad N^{15}_{\text{fertilizante}}: 10,0 \% \text{ y } N^{15}_{\text{abundancia natural}}: 0,37\%$$

Por último, se calculó el contenido de NPF (mg) presente en cada órgano a partir del porcentaje de NPF y el contenido de N total.

3.4.5 Daño oxidativo en hojas debido a la aplicación foliar de urea

En cada muestreo se tomaron dos muestras por planta (12 muestras por tratamiento), 24 horas después de que la urea fue pulverizada. Cada muestra consistió en dos hojas de dardo reproductivo. Las muestras se colocaron dentro de sobrecitos de aluminio rotulados y fueron mantenidas en agua con hielo (0 °C) mientras el muestreo era realizado. Inmediatamente después, las muestras fueron congeladas sumergiéndolas en N líquido (-70°C) y se conservaron en un freezer a - 80 °C.

El malóndialdehído (MDA) es un reconocido indicador de daño oxidativo (Del Río *et al.*, 2005). El contenido de MDA fue determinado en base a la técnica de Heath & Packer (1968), incluyendo las correcciones de Du & Bramlage (1992) y Hodges *et al.*, (1999) para evitar las interferencias debidas a azúcares y antocianinas.

Se pesó aproximadamente 0,200 g de hoja y se colocó en un mortero. Se cristalizó agregándole N líquido y se pulveriza. Ya pulverizada la muestra, se trasvasó a un eppendorf disolviéndola con 1,5 ml de una solución de Ácido TriCloroacético (TCA) al 0,1 %. Se centrifugó a 13.200 rpm por 10 minutos (13.600g). Los eppendorf con el extracto del tejido vegetal fueron conservados en hielo picado. Se tomó una alícuota de 0,5 ml del extracto vegetal y se colocó en un tubo “problema” que contenía 0,5 ml de TCA al 20 % y TBA 0,5 % (Ácido TioBarbitúrico) (**TBA+**). Otra alícuota de 0,5 ml del extracto fue colocada en un tubo “blanco” con 0,5 ml de TCA al 20 % (**TBA-**). Los tubos tapados fueron sumergidos en un baño térmico a 98 °C por 20 minutos. Inmediatamente después, la solución fue trasvasada a eppendorf y los eppendorfs fueron colocados en hielo picado. Con este descenso de la temperatura, se cortó la reacción del MDA con el TBA. Se centrifugó nuevamente a 13.200 rpm por 10 minutos (13.600g).

La absorción de la solución del tubo “problema” se midió en el espectrofotómetro a tres longitudes de onda: 532 nm (pico de absorción del producto MDA+2TBA), 440 nm (pico de absorción del producto azúcares+TBA) y 600 nm (turbidez no específica). La absorción de la solución del tubo “blanco” se midió en el espectrofotómetro a dos longitudes de onda: 532 nm (pico de absorción de las antocianinas) y 600 nm (turbidez). Los cálculos se realizaron tomando en cuenta las correcciones de Du & Bramlage (1992) y Hodges *et al.*, (1999).

$$\text{MDA (nmol/ml)} = [(A - C) - B] / 157000^d \cdot 10^6$$

- $A = A_{+532} - A_{+600}$ → estimación bruta de MDA
- $B = (A_{+440} - A_{+600}) \cdot 0,0571e$ → interferencia por sacarosa
- $C = A_{-532} - A_{-600}$ → interferencia por antocianinas
- A_{+} de la solución “problema” (TBA+) y A_{-} de la solución “blanco” (TBA -)
- $A_{600} \approx 0$
- d: coeficiente de extinción molar del MDA a 532 nm (Heath & Packer, 1968)
- e: Absorción Molar de azúcares a 532nm = 8,4 según (Du & Bramlage, 1992)

Absorción Molar de azúcares a 440nm 147

Para expresarlo en base al peso de la muestra:

$$\text{MDA (nmol/g)} = \frac{\text{MDA (nmol/ml)} \cdot \text{volumen de extracción (ml)} \cdot \text{Dilución}}{\text{Peso Fresco de la muestra (g)}}$$

Según nuestra técnica:

- volumen de extracción: 1,5 ml
- Dilución: 2 (1 ml de solución final/ 0,5 ml de extracto)
- Peso Fresco de la muestra \approx 0,2 g

3.5 Análisis estadístico empleado

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa InfoStat (2009). En todos los casos en los cuales se comparaban las medias de las variables de interés entre dos tratamientos, se realizaron pruebas t con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0.05$). En aquellos casos en los cuales se evaluaban dos factores, se realizaron análisis de la varianza bifactorial. En estos casos, las diferencias entre los tratamientos fueron analizadas mediante la prueba LSD de *Fisher*.

El cumplimiento de los supuestos fue corroborado mediante la prueba de *Shapiro Wilks* (modificado) en base a los residuos para el caso de la distribución normal, y la prueba de *Levene* (Análisis de la varianza de los residuos absolutos) para el caso de la homogeneidad de las varianzas. Los casos en los cuales no se cumplían los supuestos y por lo tanto no se pudo realizar dicho análisis, se aclarará pertinentemente.

Los resultados de los p-valores son reportados mediante símbolos:

NS: p-valor $> 0,05$

* : p-valor: 0,01-0,05

** : p-valor: 0,001-0,01

*** : p-valor $< 0,001$

3.5.1 Carga frutal y caída de frutos

Se realizó análisis de la varianza de una o dos vías según correspondía para todas las variables de respuesta que incluían el número de frutos cosechados: N° de frutos cosechados por árbol, N° de frutos cosechados por ramilletes florales, N° de frutos cosechados por AST y N° hojas por Fruto cosechado. En el caso de las variables de respuesta que contenían el número de frutos a los 45 DDPF, previo a realizar el raleo manual (N° de frutos a los 45DDPF por ramilletes florales y N° de frutos a los 45DDPF por ASR) se realizaron pruebas t.

Para evaluar el patrón de caída de los frutos en árboles pulverizados o testigos en cada cuadro: 5N1 y 5N4, se realizaron dos estrategias de análisis.

La primera consistió en pruebas t entre tratamientos para cada fecha evaluada para las siguientes variables respuestas: número de frutos presentes en el dardo, y caída de frutos entre fechas evaluadas. Se trabajó sobre valores medio de cada árbol.

Otra estrategia de análisis se basó en el trabajo presentado por Gimenez *et al.* (2008) evaluando el patrón de caída natural de frutos en perales cv. *Williams*. La regresión entre la variable regresora (X: Días Después de Plena Floración) y la variable respuesta (Y: Porcentaje de frutos caídos desde la floración) se ajusta a una curva logística (Gimenez *et al.*, 2008).

$$Y = \frac{A}{1 + e^{B - C X}}$$

En este modelo, e es la base de los logaritmos naturales (2,718), el valor de “**A**” representa a la asíntota superior, **el máximo porcentaje de caída final**, “**B**” es un parámetro relacionado con la ordenada al origen de la función, **la caída en el momento cero** y por último, “**C**” es un parámetro asociado con la tasa de cambio de la curva desde un valor inicial hasta un valor final, **la tasa media de caída a lo largo del ciclo**. Luego se obtiene el máximo de la derivada de la función ajustada y se obtiene el momento de máxima caída.

Se realiza una regresión para cada población: plantas testigos y plantas pulverizadas de cada cuadro. Se realizan intervalos con un 95 % de confianza para cada uno de los parámetros estimados en cada población (A, B y C) y se evalúa si las curvas justadas difieren en alguno de estos parámetros.

3.5.2 Producción y tamaño de frutos

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la producción y el tamaño de los frutos se realizó análisis de la varianza de una o dos vías según correspondía para las variables de respuesta: producción por árbol, eficiencia productiva, peso medio de fruto y calibre medio de fruto.

Para evaluar si los frutos cosechados en los árboles que recibieron distintos tratamientos presentaban una distribución de calibres diferenciada se realizaron tablas de contingencia con el número de frutos y la producción entre las distintas categorías de tamaño. Una vez corroborado este punto se realizaron análisis de la varianza o pruebas t dentro de cada categoría para determinar estas diferencias.

En base al gráfico de dispersión entre el peso medio de fruto y la relación hoja/fruto de cada árbol se analizó el nivel adecuado de carga frutal para las plantas del cuadro 5N1. Luego, se realizó una regresión lineal entre el número y el peso medio de fruto en el árbol según lo expuesto por Link (2000).

Por último para determinar el nivel de carga frutal óptimo para los árboles del cuadro 5N1 se realizó el análisis propuesto por Link (2000) en base a los datos de las tres cosechas. La producción de los árboles fue separada en tres categorías de tamaño de fruto: chico (diámetro menor a 60 mm), mediano (diámetro entre 60 y 70 mm) y grande (diámetro mayor a 70 mm). Posteriormente se clasificaron los árboles según el número de frutos que presentaron al momento de la cosecha en 5 grupos desde 200 hasta 600 frutos. En cada grupo, quedaron entre 9 y 13 individuos. Por último se graficó la producción de frutos de cada tamaño según cada nivel del carga frutal.

3.5.3 Número y tamaño de las células del fruto en cosecha

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la cantidad y el tamaño de las células en los frutos en la cosecha, se realizaron pruebas *t* para las variables de respuesta: número de células, número de capas, diámetro celular medio y volumen celular.

En base a la estrategia de análisis presente en Goffinet *et al.* (1995), se seleccionó al peso del fruto como indicador del tamaño y se evaluó la relación entre el peso del fruto y el número de células o el volumen celular mediante regresiones lineales y cuadráticas.

Para evaluar el efecto del tratamiento con urea sobre el número de semillas presente en los frutos cosechados se realizó una prueba *t*. En base a la muestra de 100 frutos de la cosecha del año 2009, se analizó la relación entre el número de semillas y los parámetros celulares de los frutos. En base a los datos de 250 frutos se analizó la relación entre el número de semillas y el peso de los frutos. Debido al limitado número de frutos con más de 5 semillas, se los agrupó en una categoría “entre 6 y 9 semillas”. Se realizaron gráficos de puntos del número de células, el volumen celular y peso de fruto según el número de semillas presente.

3.5.4 Destinos y partición del nitrógeno proveniente del fertilizante

El contenido de nitrógeno foliar poscosecha de los árboles del cuadro 5N1 fue evaluado mediante pruebas *t* en cada año.

En los ensayos realizados en el cuadro 5N4, se realizaron pruebas *t* dentro de cada fecha muestreada para evaluar diferencias significativas entre las medias para las siguientes variables de respuesta:

- I. Porcentaje de nitrógeno en hojas y flores-frutos
- II. Contenido de nitrógeno en hojas y flores-frutos
- III. N° de hojas y N° de flores-frutos
- IV. Peso fresco y seco total del dardo
- V. Área foliar, área específica, peso fresco y seco del conjunto de hojas del dardo
- VI. Área foliar, peso fresco y seco por hoja en singular
- VII. Peso fresco y seco de la totalidad de las flores-frutos
- VIII. Peso fresco y seco por flor-fruto en singular.

Además de determinar el porcentaje de nitrógeno proveniente del fertilizante (NPF), se calculó su contenido (mg) en hojas y flores-frutos y se realizó análisis de la varianza entre las fechas muestreadas para evaluar si el nitrógeno ingresado en los tejidos luego era redistribuido.

3.5.5 Daño oxidativo en hojas debido a la aplicación foliar de urea

Para evaluar el contenido de malón di aldehído (MDA), se realizó para cada temporada un análisis de varianza bifactorial en el cual un factor es la pulverización de urea al 5% y el otro factor es la estación en la cual se realiza la aplicación: primavera o fines de verano. La interacción entre estos dos factores es significativa, por lo cual se realizaron las comparaciones entre los cuatro tratamientos y sus diferencias fueron analizadas mediante la prueba LSD de Fisher.

Otras variables de interés para caracterizar estos dos momentos son: las interferencias debidas a azúcares (sacarosa y fructosa) calculadas según Du & Bramlage (1992) y las interferencias debidas a antocianinas determinadas según Hodges *et al*, (1999). Para estas variables se realizaron pruebas *t* con la época de muestreo como factor (estos resultados se encuentran en el anexo).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Carga frutal y caída de frutos

En la temporada 2006-2007 los perales cv *Williams* de la región presentaron una baja densidad floral en general (véase la tabla 3.2), por lo que todas las plantas del ensayo presentaron poca cantidad de frutos, baja carga frutal (Nº frutos por área seccional de tronco) y altos valores de cuaje. En la temporada 2008-2009, la carga frutal se aproximó a los valores esperados para una plantación de estas características. En la tabla 4.1 se resumen los resultados referidos al número de frutos cosechados durante las tres temporadas, relacionándolo con el número de ramilletes florales de los árboles, el área seccional de tronco y el número de hojas.

Tabla 4.1. Número de frutos por árbol, por corimbo, por área seccional de tronco (AST) y número de hojas por fruto en las tres temporadas de ensayo

Temporada y cuadro	Tratamientos	Nº frutos por árbol	Nº frutos / corimbo	Nº frutos / AST (cm ²)	Nº hojas por fruto
2006-2007 5N1	Testigo	334	2,15 b	1,43	58,3
	Urea al 5%	294	2,48 b	1,37	73,3
	Raleo Manual	236	1,64 a	1,01	72,6
	Urea al 5% + Raleo Manual	237	1,70 a	1,23	66,3
		NS	**	NS	NS
2007-2008 5N1	Testigo	420 b	1,29	2,27	51,2
	Urea al 5%	331 a	1,18	1,75	50,6
		*	NS	NS	NS
2008-2009 5N1	Testigo	638	1,34	2,73	32,5
	Urea al 7,5%	615	1,36	2,66	33,6
		NS	NS	NS	NS
2008-2009 5N4	Testigo	326	1,67	2,58	DNE
	Urea al 7,5%	329	1,62	2,52	DNE
		NS	NS	NS	

NS, * y **. No significativo o significativo con p-valor <0,05 y 0,01 respectivamente.

DNE: Datos no evaluados.

En el cuadro 5N1, promediando las tres temporadas, la pulverización de urea en floración disminuyó el número de frutos cosechados en un 12%. Sin embargo, sólo en la temporada 2007-2008 esta diferencia alcanzó a ser significativa con valores de 21%. Menor es el efecto de la aplicación de la urea si se evalúa a través del número de frutos por ramillete floral. En este parámetro, el tratamiento no logró diferenciarse significativamente del testigo en ninguna de las tres temporadas evaluadas. El raleo manual a los 45 DDPF realizado en la primera temporada disminuyó el cuaje en un 24 %. En el cuadro 5N4, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados. En definitiva, el efecto de la aplicación de urea en floración sobre el número de frutos en el momento de la cosecha fue muy limitado

En manzanos, Handschack & Alexander (2002) también encontraron un limitado efecto raleador de la aplicación de la urea en floración: promediando los resultados de cuatro temporadas, la urea disminuyó el cuaje en tan sólo un 5 %. En contraposición Schröder & Link (2002) encontraron disminuciones en el cuaje más marcadas con aplicaciones de urea en caída de pétalos o yema hinchada. (28 % y 50 %, respectivamente) Al parecer, el efecto de la urea sobre manzanos es variable y puede depender del momento en que se realiza la aplicación.

Sánchez *et al.* (2007) encontraron que la urea pulverizada en floración generaba efecto raleador interesante sobre perales cv. *Williams* en los Estados Unidos (cuajes entre 20 y 35 % menor). Sin embargo, los resultados de las experiencias realizadas en Argentina no resultaban del todo concluyentes respecto a esta variable a pesar de ser realizados sobre la misma especie y variedad. Posteriormente, en los ensayos realizados en esta tesis se observó que **la aplicación de la urea sobre perales cv. Williams en floración generó un efecto raleador muy pequeño en base al número de frutos presentes en la cosecha.**

Sin embargo, en el año 2006, en un conteo realizado sobre 250 dardos doce días después del tratamiento con urea, el 55 % de los dardos pulverizados presentaban menos de cinco frutos. En tanto que el 62 % de los dardos testigos presentaban 5 o más frutos. Por lo cual, **la pulverización de urea al 5% en floración generó una caída de frutos de perales cv. Williams en los primeros 12 días.** Estos resultados, resaltan la necesidad de realizar determinaciones más tempranas en la temporada.

En el cuadro 5N1, a los 45 días después de la floración, en ramas de árboles pulverizados con urea al 7,5% se observó una disminución del 13 % en el cuaje y del 17 % en la carga, si bien esta última no resulta estadísticamente significativa (Tabla 4.2). En el cuadro 5N4, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros.

Tabla 4.2. Número de frutos por ramillete floral y área seccional de rama en perales cv. Williams a los 45 días después de plena floración

Cuadro	Tratamiento	Nº frutos por ramillete floral	Nº de frutos Por ASR (cm ²)
5N1	Testigo	2,31	2,30
	Urea al 7,5%	2,01	1,90
		*	NS
5N4	Testigo	1,93	2,85
	Urea al 7,5%	1,84	2,72
		NS	NS

ASR: Área Seccional de Rama

NS: Diferencia no significativa. *: Diferencia significativa al 5 %.

Para determinar el momento en que este tratamiento ocasiona una mayor caída de frutos respecto al testigo, se realizó un seguimiento a lo largo de la temporada del número de frutos presente en los dardos de los árboles del ensayo. En las figuras 4.1 y 4.2 se puede observar la evolución del número de frutos presentes en dardos de plantas testigo *versus* tratadas en el cuadro 5N1 y el cuadro 5N4, respectivamente. La principal disminución en el número de frutos ocurre en los primeros días después de la floración (Figuras 4.1 y 4.2). En la primera fecha evaluada, los dardos de las plantas pulverizadas presentaban un similar número de frutos que los dardos de las plantas testigos. En el cuadro 5N1, a partir de la segunda fecha evaluada (el 14 de Octubre) los dardos de plantas tratadas presentaban un menor número de frutos que los dardos de plantas testigos, si bien estas diferencias no resultan significativas. En el cuadro 5N4, si bien se observan algunas diferencias en determinados momentos, a partir de los 45 DDPF (10 de Noviembre) no se observan diferencias entre los tratamientos.

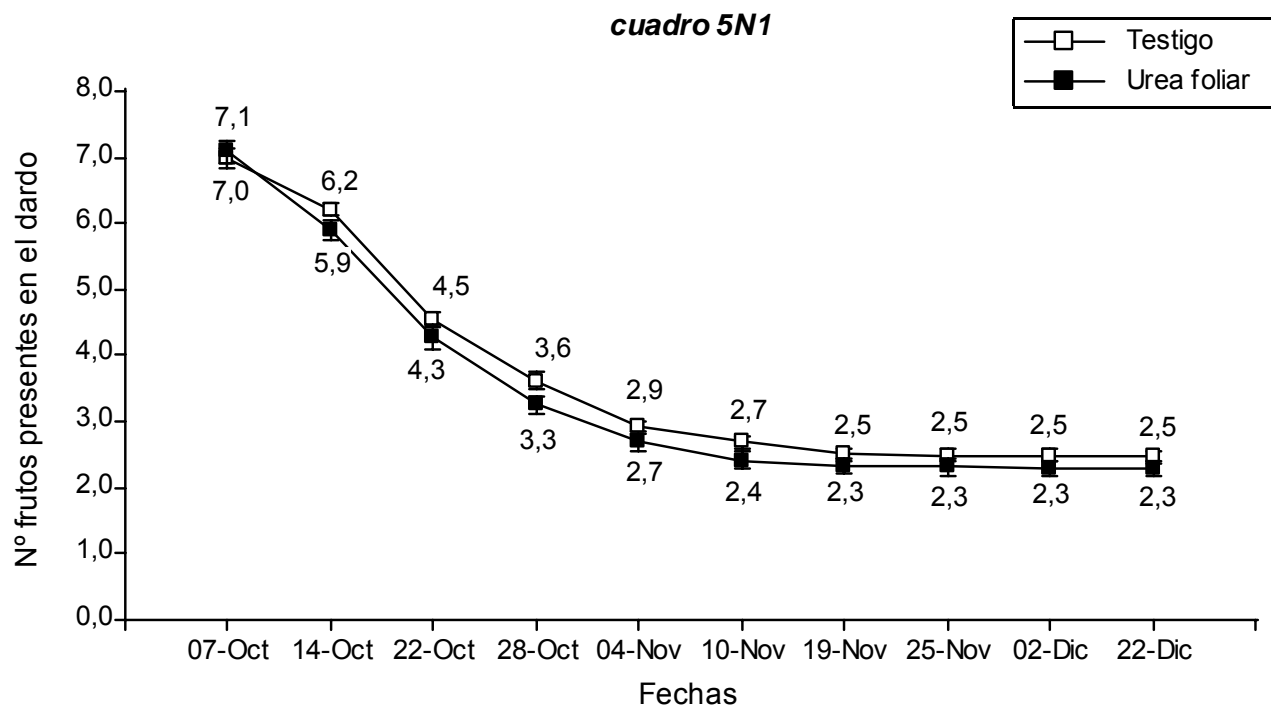


Figura 4.1: Número de frutos presentes en el dardo en el año 2008 en plantas testigo (símbolos blancos) y plantas que fueron pulverizadas con urea al 7,5 % en plena floración (símbolos negros) en el cuadro 5N1. Valores medios \pm Error estándar.

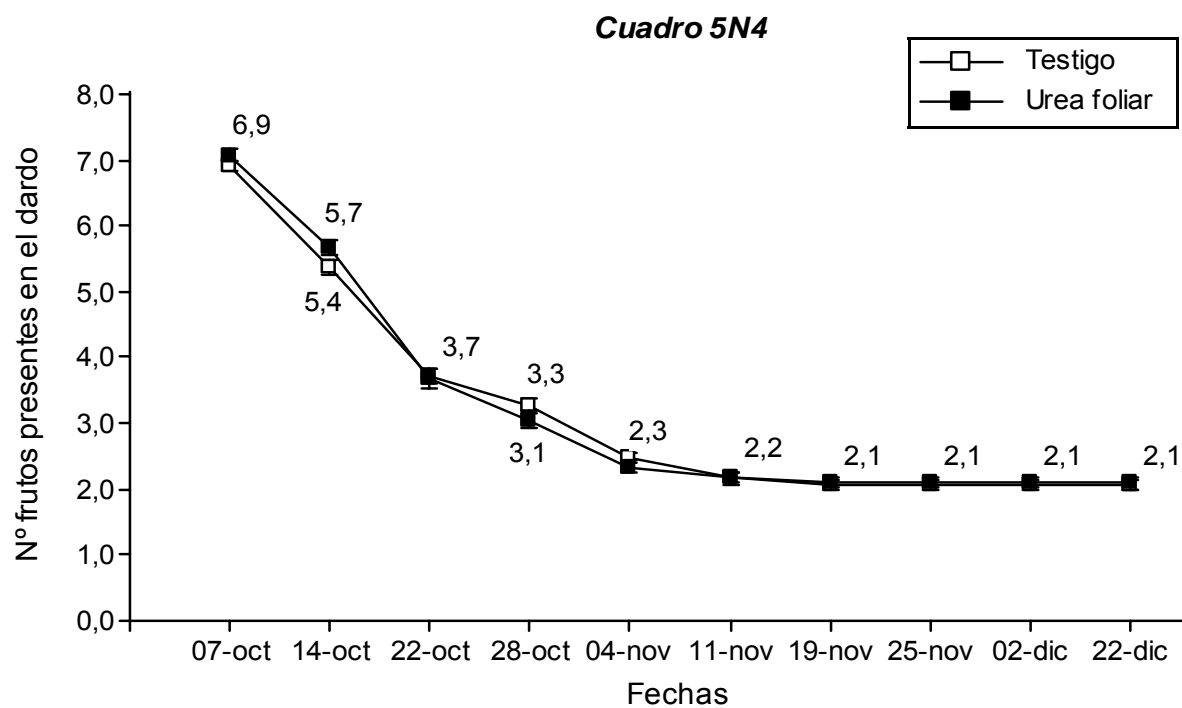


Figura 4.2: Número de frutos presentes en el dardo en el año 2008 en plantas testigo (símbolos blancos) y plantas que fueron pulverizadas con urea al 7,5 % en plena floración (símbolos negros) en el cuadro 5N4. Valores medios \pm Error estándar.

A partir de la diferencia en el número de frutos en cada dardo se obtuvo la caída de frutos por dardo entre fechas evaluadas. En las figuras 4.3 y 4.4 se grafica la caída de frutos a los largo de la temporada en el cuadro 5N1 y el cuadro 5N4, respectivamente. En cada cuadro se manifestó un patrón de caída de frutos diferente. En el Cuadro 5N1, se observó un único pico de caída de frutos entre el 14 y el 22 de Octubre; en tanto que en el cuadro 5N4, además de este pico principal, se observó un segundo pico de caída de frutos de menor magnitud entre el 28 de Octubre y el 4 de Noviembre.

En el cuadro 5N1, el tratamiento con urea presentó una caída de frutos 47,5% superior, entre los 12 y los 19 días después de la aplicación (14 de octubre) (*p-valor*: 0,08). Mientras que en el cuadro 5N4, el incremento en la caída de frutos se manifestó más tardíamente, entre los 20 y 28 DDA (22 de Octubre), y presentó una menor magnitud (21 %). Por lo tanto **la aplicación de urea al 7,5 % sobre perales cv. Williams en floración generó una caída de frutos entre 2 y 4 semanas después de la aplicación.**

Estos resultados concuerdan con Zilkah *et al.* (1988) y Rahemi & Ramezani (2007). Zilkah *et al.* (1988) menciona que la aplicación foliar de urea al 8% sobre durazneros y nectarines en plena floración generó una caída de frutos entre una y dos semanas después de la aplicación. En tanto que Rahemi & Ramezani (2007) encontraron en pistachos una caída 20 % superior a la del control durante las dos primeras semanas luego de una aplicación foliar de urea al 5% 10 DDPF.

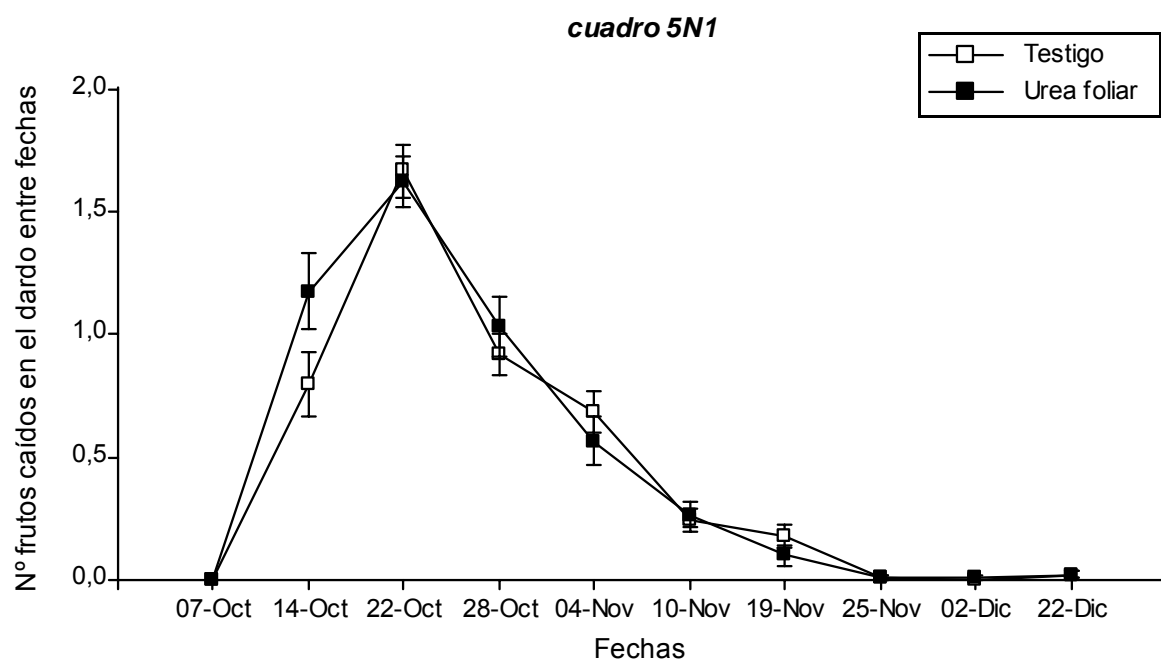


Figura 4.3: Número de frutos caídos por dardo entre fechas del año 2008 en plantas testigo (símbolos blancos) y plantas que fueron pulverizadas con urea al 7,5 % en plena floración (símbolos negros) en el cuadro 5N1. Valores medios \pm Error estándar.

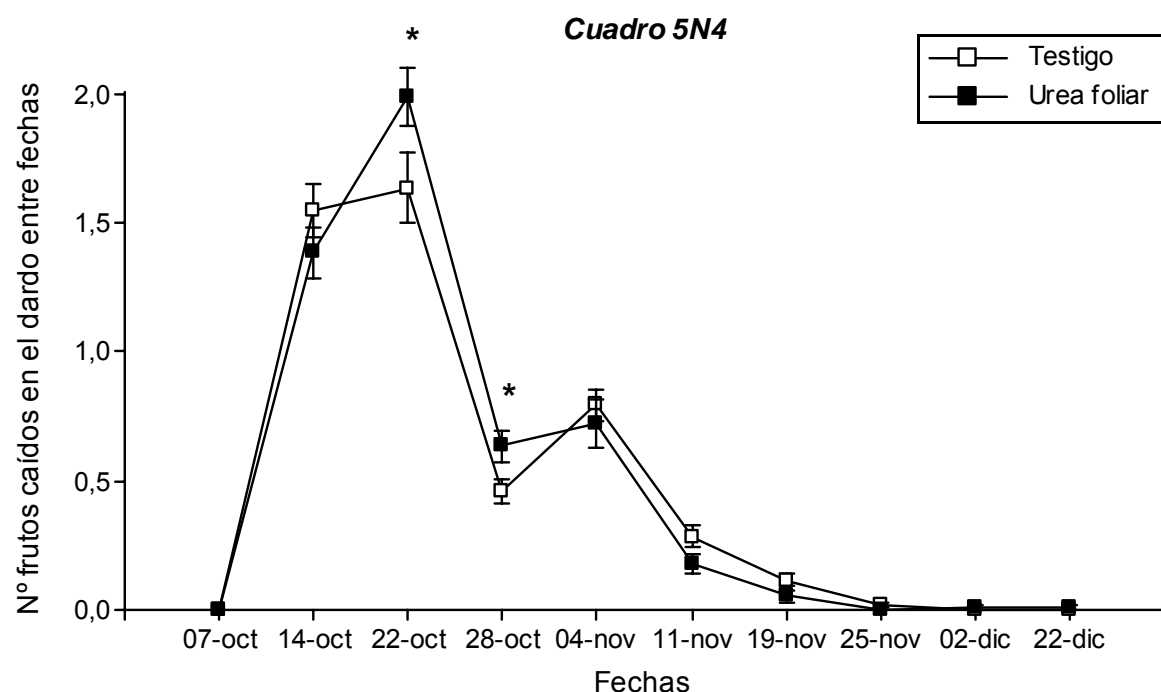


Figura 4.4: Número de frutos caídos por dardo entre fechas del año 2008 en plantas testigo (símbolos blancos) y plantas que fueron pulverizadas con urea al 7,5 % en plena floración (símbolos negros) en el cuadro 5N4. Valores medios \pm Error estándar. *: Diferencia significativa al 5%.

En el 2008, Gimenez *et al.* estudiaron el patrón de caída de frutos en perales cv. *Williams* en la temporada 2007-2008. Los autores ajustaron una curva logística relacionando el porcentaje de frutos caídos (Y) respecto a los días después de plena floración (X) con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,96.

$$Y = \frac{A}{1 + e^{B - C X}}$$

En la curva ajustada, el valor de A, correspondiente a la asíntota superior, fue de 86, por lo cual en hacia el final de esa temporada el 86 % de las flores terminaron cayéndose. La ordenada al origen de la función ajustada (parámetro B) fue de 5,4, lo cual refleja la magnitud de caída en el momento inicial. Por último, el parámetro C presentó un valor de 0,246, relacionado con la frecuencia media de caída de frutos a lo largo del ciclo. El valor de X en el máximo valor de Y de la función derivada fue 22, por lo cual se concluye que el pico máximo de caída de frutos ocurrió a los 22 DDPF, el 25 de Octubre de 2007. Es probable que la velocidad del viento durante el mes de octubre afecte la fecha de caída máxima de frutos.

En la figuras 4.5 y 4.6 se grafica el porcentaje de frutos caídos en cada árbol según los DDPF para el cuadro 5N1 y 5N4 respectivamente. En cada cuadro y para cada tratamiento se ajustó una función logística a los valores observados. Las curvas presentaron coeficientes de determinación (R^2) con valores altos: 0,95 en el cuadro 5N1 y 0,93 en el cuadro 5N4.

Cuadro 5N1

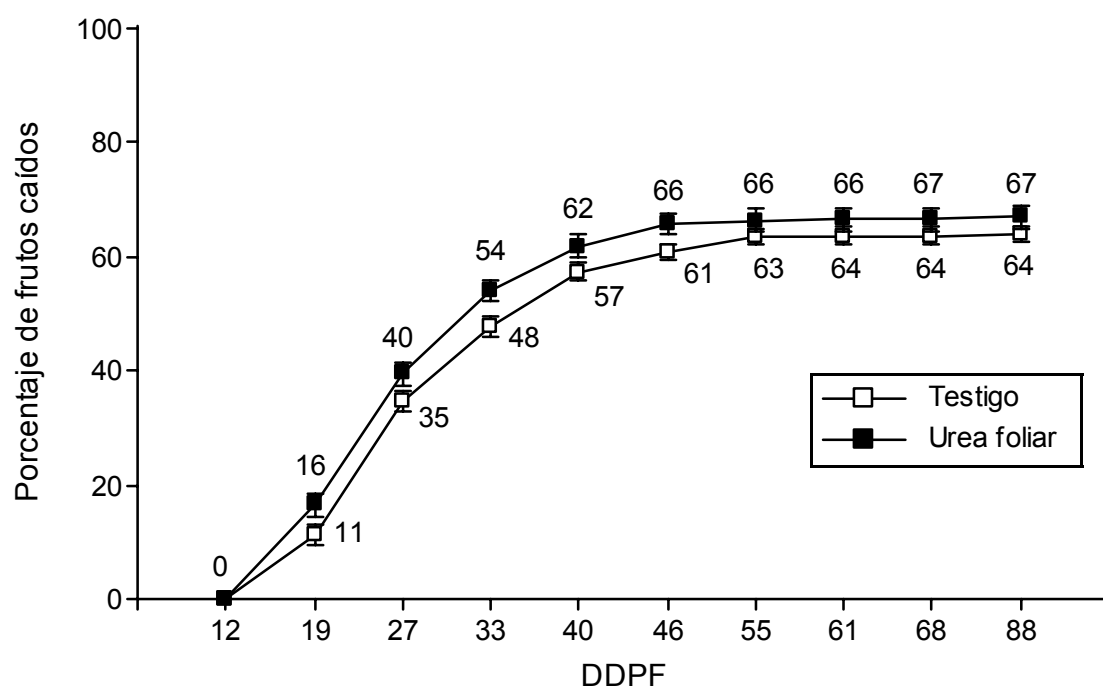


Figura 4.5: Porcentaje de frutos caídos en el año 2008 en plantas testigo (símbolos blancos) y plantas que fueron pulverizadas con urea al 7,5 % en plena floración (símbolos negros) en el cuadro 5N1. Valores medios \pm Error estándar.

5N4

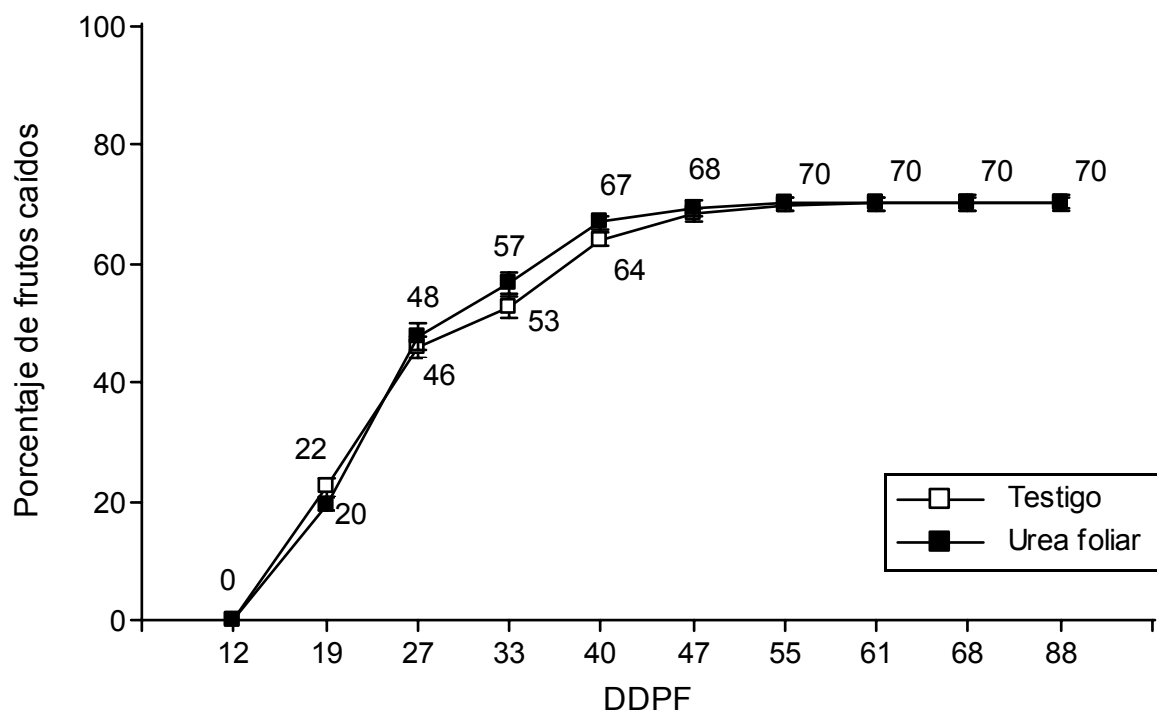


Figura 4.6: Porcentaje de frutos caídos en el año 2008 en plantas testigo (símbolos blancos) y plantas que fueron pulverizadas con urea al 7,5 % en plena floración (símbolos negros) en el cuadro 5N4. Valores medios \pm Error estándar.

En la tabla 4.3 se presentan los parámetros A, B y C de las curvas ajustadas para cada tratamiento en cada cuadro. En la temporada 2008-2009 se observaron entre 63,2 y 69,7 % de caída total de frutos (parámetro A). Estos valores son inferiores al 86 % reportado por Giménez *et al.* (2008) en la temporada 2007-2008. Esta diferencia puede estar relacionada con aspectos de la parcela (edad de las plantas, densidad de floración), cuestiones de manejo (riego, fertilización, poda) y características ambientales de la temporada (temperaturas y vientos).

Tabla 4.3: Valor e intervalos de 95 % de confianza para los parámetros de las curvas logísticas ajustadas al porcentaje de frutos caídos en función de los DDPF.

Cuadro	Tratamiento	A			B			C		
		Valor	Límites 95% confianza		Valor	Límites 95% confianza		Valor	Límites 95% confianza	
5N1	Testigo	63,2	61,8	64,5	5,24	4,54	5,94	0,196	0,170	0,223
	Urea foliar	66,3	64,7	68,0	5,10	4,31	5,89	0,202	0,171	0,233
5N4	Testigo	69,7	68,3	71,1	4,19	3,71	4,66	0,171	0,152	0,190
	Urea foliar	69,7	68,5	70,9	5,07	4,50	5,64	0,211	0,188	0,234

DDPF: Días Después de Plena Floración

En los intervalos con un 95 % de confianza para el valor de cada parámetro, se puede observar que en el cuadro 5N1, los árboles pulverizados presentaron un mayor porcentaje final de caída de frutos respecto a los árboles testigos (parámetro A). En el cuadro 5N4, se observa superposición en todos los intervalos de confianza de los parámetros entre los tratamientos.

En base a todos los aspectos mencionados respecto a la caída de frutos podemos ver que el efecto raleador fue más consistente en el cuadro 5N1 que en el cuadro 5N4. Se desconocen los factores que determinan estas diferencias pero entre ellos pueden encontrarse: la edad de los árboles (34 y 16 años), la carga frutal, el sistema de riego de la parcela y las condiciones ambientales en el momento de aplicación (la aplicación en el cuadro 5N1 fue hecha a la mañana, en tanto que en el cuadro 5N4 fue realizada a la tarde).

En la figura 4.7, se grafica los valores de velocidad media diaria del viento a 10 metros de altura para el mes de octubre de los años 2007 y 2008 (datos de la estación meteorológica de la estación experimental del INTA Alto Valle). En el año 2007, el día más ventoso de octubre fue el 25, coincidente con el día de máxima caída de frutos encontrado por Giménez *et al.* (2008). Esto refleja que el viento es un factor extremadamente importante en el fenómeno de caída de frutos. En el año 2008, el día más ventoso de octubre fue el 21 y nuevamente coincidió con el día de máxima caída de frutos para los árboles testigos del cuadro 5N1 (27 DDPF). En el caso de los árboles pulverizados con urea, el valor máximo de “Y” en la derivada de la función ajustada correspondió a un valor de “X” menor: 25 DDPF. Esto indicaría que la caída máxima de frutos en estos árboles se adelantó dos días.

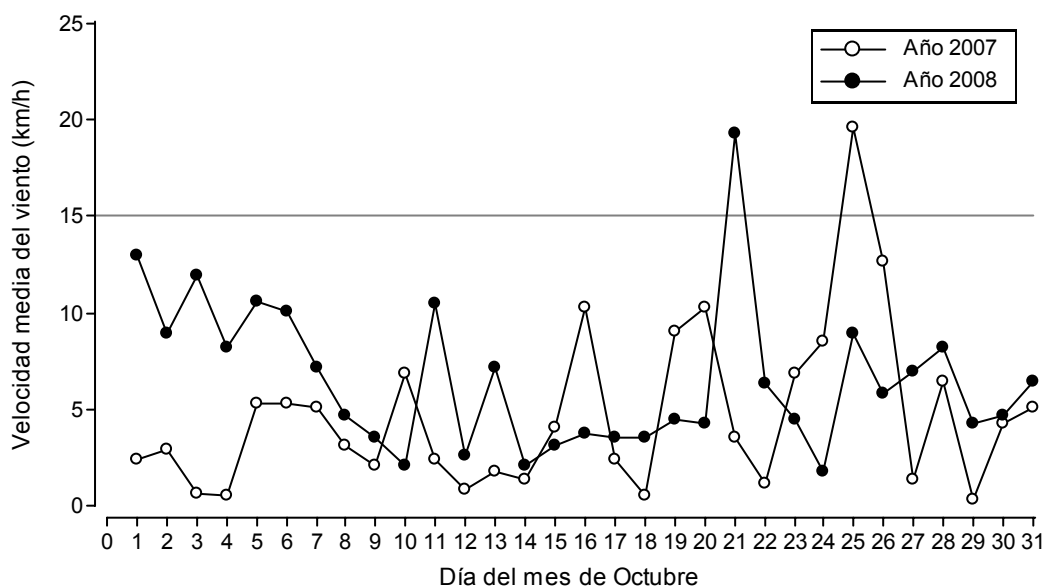


Figura 4.7. Velocidad media diaria del viento a 10 metros de altura para el mes de Octubre del año 2007 (símbolos blancos) y 2008 (símbolos negros). Datos de la estación meteorológica de la estación experimental del INTA Alto Valle.

En definitiva, en los casos en los que el tratamiento resultó efectivo, **la aplicación foliar de urea al 5-7,5 % sobre perales cv. Williams en plena floración generó una mayor caída de frutos en los primeros 21 días después de la aplicación y una leve disminución del número de frutos en el momento de la cosecha (12%).**

4.2 Producción y tamaño de frutos

En la tabla 4.4 se presenta la producción por árbol y la eficiencia productiva de cada tratamiento en los distintos ensayos. En los dos primeros años, los árboles del cuadro 5N1 presentaron una producción baja, en términos de rendimiento entre 36 y 41 toneladas por hectárea. La poda corta realizada en ese cuadro puede haber contribuido a este bajo rendimiento, por haber dejado una densidad floral aún menor en las plantas. En la temporada 2008-2009, el rendimiento de ambos cuadros se situó entre 56 y 57 toneladas por hectárea, lo cual es considerado como un buen rendimiento.

Tabla 4.4. Producción y eficiencia productiva de los árboles cosechados en las tres temporadas de ensayo

Temporada y cuadro	Tratamientos	Producción por árbol (kg)	Eficiencia productiva (g. cm ⁻²)
2006-2007 5N1	Testigo	70,2	300,0
	Urea al 5%	59,1	276,9
	Raleo Manual	49,7	213,1
	Urea al 5% + Raleo Manual	52,0	105,5
		NS	NS
2007-2008 5N1	Testigo	69,8	375,8
	Urea al 5%	59,4	280,9
		*	*
2008-2009 5N1	Testigo	89,1	386,3
	Urea al 7,5%	91,2	399,2
		NS	NS
2008-2009 5N4	Testigo	47,7	375,9
	Urea al 7,5%	50,3	381,9
		NS	NS

NS: No significativo. *: Significativo al 5%

La pulverización con urea al 5% sobre perales cv *Williams* disminuyó su producción en alrededor de 15% en las dos primeras temporadas, si bien sólo logró la significancia en la 2ª temporada. En la temporada 2008-2009, el tratamiento con urea al 7,5 % no modificó la producción de los perales en ninguno de los dos cuadros.

En la tabla 4.5 se informa el peso medio y el diámetro medio de fruto de cada tratamiento en los distintos ensayos. En la primera temporada, los frutos presentaron un muy buen tamaño, debido a la baja carga de los árboles. En la tercera temporada, en la cual se obtuvo un buen rendimiento, el tamaño de los frutos fue bastante menor.

Tabla 4.5: Peso y diámetro medio de fruto según el tratamiento en cada cosecha

Temporada y cuadro	Tratamientos	Peso medio de fruto (g)	Diámetro medio de fruto (mm)
2006-2007 5N1	Testigo	213	71,7
	Urea al 5%	201	70,2
	Raleo Manual	212	71,6
	Urea al 5% + Raleo Manual	228	73,4
		NS	NS
2007-2008 5N1	Testigo	167	65,7
	Urea al 5%	174	66,6
		NS	NS
2008-2009 5N1	Testigo	141	61,6
	Urea al 7,5%	150	63,1
		NS	NS
2008-2009 5N4	Testigo	147	62,7
	Urea al 7,5%	153	63,6
		NS	NS

NS: No significativo

No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los dos parámetros en ninguno de los ensayos. Esto puede deberse al limitado número de repeticiones de estos parámetros, ya que sólo se obtiene un dato por árbol. De todas maneras, exceptuando la primera temporada, el tratamiento con urea incrementó el peso medio de los frutos entre 4 y 6 %.

Este incremento es mucho menor al 10-20 % mencionado en duraznos y nectarines (Zilkah *et al.*, 1988) o al incremento entre 10-40 % citado en manzano (Handsack & Alexander, 2002; Schröder & Link, 2002). En perales cv. Williams, Sánchez *et al.*, (2007) también encontraron mayores incrementos en el peso medio de fruto en los dos países en los que se evaluó esta práctica. Si bien en Argentina el incremento fue menor al encontrado en los Estados Unidos (11 % versus 17 %).

En base a las cosechas realizadas en el cuadro 5N1, se estudió la relación del peso medio de fruto con el número de hojas por fruto (Figura 4.8). Westwood (1982) menciona que en general se requieren entre 20 y 40 hojas por fruto para un equilibrio apropiado entre el tamaño del fruto y la producción. El nivel adecuado de hojas para proveer carbohidratos al fruto depende del tipo de árbol: en plantas pequeñas, en las cuales la totalidad de las hojas se encuentran expuestas a la luz, se requiere un menor número de hojas para mantener adecuadamente un fruto que en plantas voluminosas o añejas en las cuales parte de su follaje se encuentra sombreado. En durazneros o manzanos sobre pie franco, Ryugo (1988) reporta que se requiere entre 50 y 70 hojas por fruto para obtener frutos de tamaño comercial. En el cuadro 5N1, las plantas tenían más de 30 años, eran voluminosas y presentaban una gran cantidad de brotes vigorosos en la parte superior del árbol, denominados “chupones”, las cuales no aportan fotoasimilados a los frutos. En el gráfico 4.8, se observa que se necesitan al menos 60 hojas para proveer adecuadamente carbohidratos a los frutos en este cuadro. Tomando en cuenta que hemos estimado que estos árboles presentan alrededor de 20.000 hojas, se calcula que cada árbol puede mantener adecuadamente alrededor de 350 frutos.

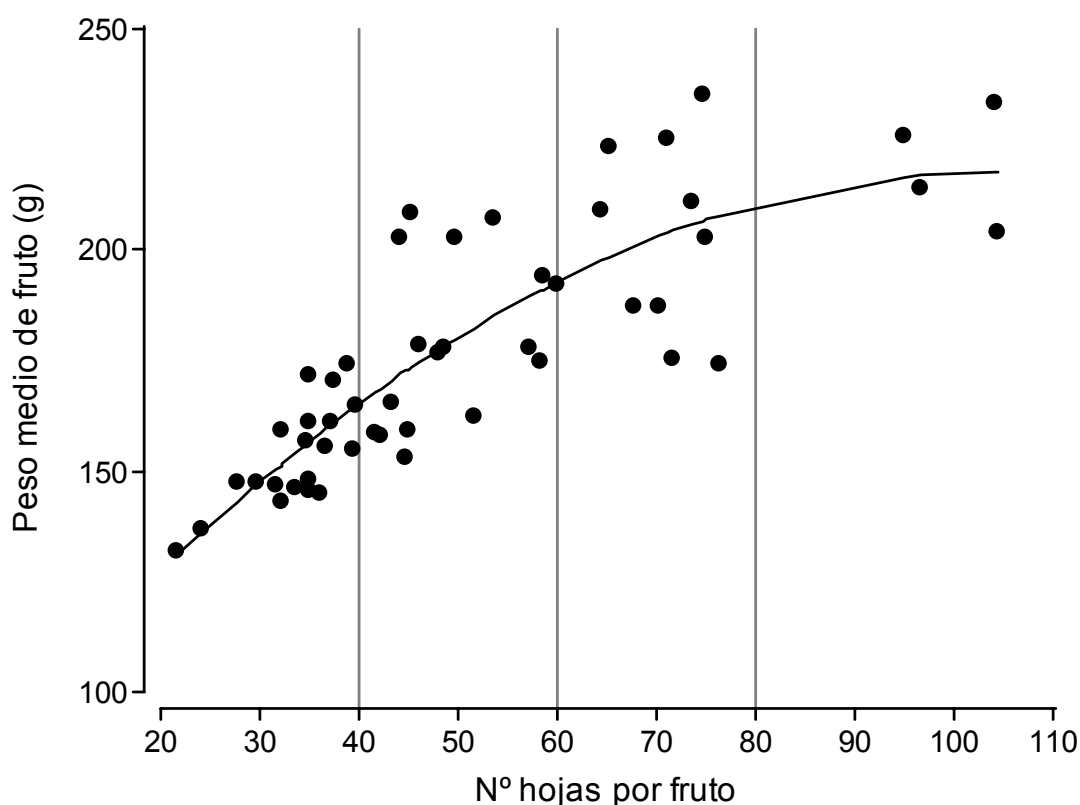


Figura 4.8. Relación entre el peso medio de fruto y el número de hojas por fruto en base a datos sobre árboles del cuadro 5N1 durante tres cosechas sucesivas.

En la figura 4.9 se grafica la relación entre el peso medio de fruto y el número de frutos en árboles del cuadro 5N1, según el tratamiento y el año de la cosecha. Es notorio que prácticamente todos los datos de la cosecha del año 2007 (triángulos) presentan menos de 350 frutos por árbol y los valores más altos de número de frutos por árbol corresponden a las cosechas 2008 y 2009. Se ajustó una regresión lineal entre estas dos variables.

$$\text{Peso medio de fruto (g)} = 248 - 0,17 \cdot \text{N}^\circ \text{ de frutos en el árbol. } R^2: 0,68.$$

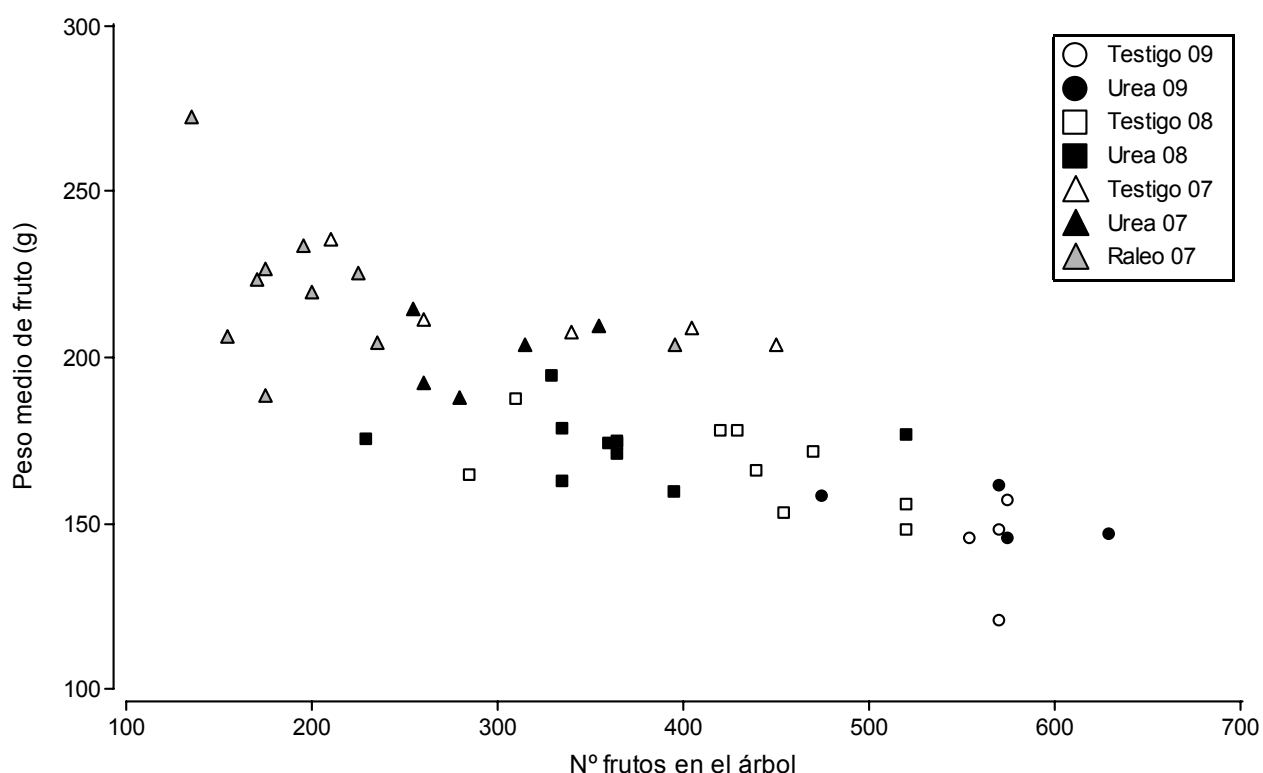


Figura 4.9. Relación entre el peso medio de fruto (g) y el número de frutos en árboles del cuadro 5N1 según el año de la cosecha: 2007 (triángulos), 2008 (cuadrados) y 2009 (círculos) y el tratamiento: testigo (símbolos blancos), urea foliar (símbolos negros) y raleo manual (símbolos grises).

La temporada 2006-2007, de baja densidad floral, se caracterizó por presentar tamaños grandes de fruto. De hecho es la única cosecha en la cual se unieron las dos categorías de tamaño más chico (< 60mm. y 60- 65 mm.) debido al escaso número de frutos que presentaban. En esta cosecha se encontraron diferencias sumamente significativas en la distribución de la producción (χ^2 según *Pearson* = 0,0005), pero estas diferencias no se deben al tratamiento con urea sino al raleo manual, el cual disminuyó fuertemente la cantidad de frutos chicos y medianos en la cosecha (Figura 4.10). Es interesante destacar que si bien el raleo manual disminuyó la cantidad de frutos pequeños, no por esto logró mayor cantidad de frutos grandes. Esto puede deberse a la baja carga frutal de la temporada.

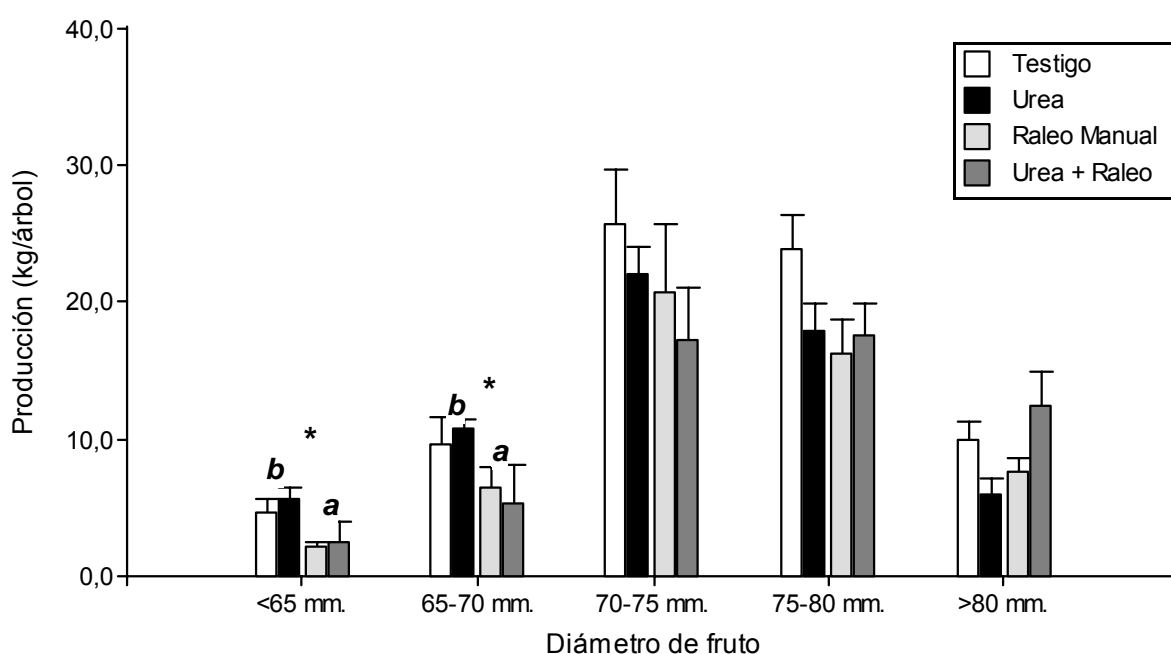


Figura 4.10 Distribución de la producción del árbol en función del diámetro de los frutos en los árboles de cuadro 5N1, en la temporada 2006-2007. Valores medios \pm Error estándar. *: Significativo al 5 %, del raleo manual en el análisis bifactorial.

En la temporada 2007-2008, el tratamiento con urea presenta una distribución de la producción distinta al testigo (χ^2 según *Pearson* = 0,0082) pero una vez más esta diferencia se basa en una menor cantidad de frutos chicos y medianos (< 70 mm) y sólo se observa un incremento no significativo del 32 % en la producción de frutos con diámetro entre 75 y 80 mm (Figura 4.11).

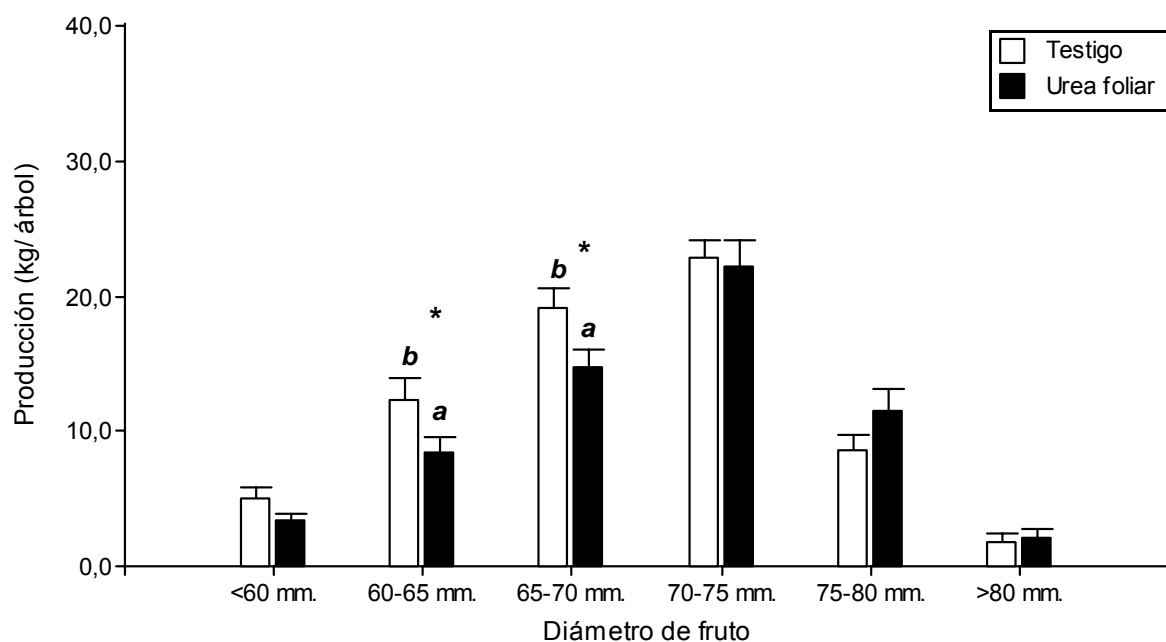


Figura 4.11 Distribución de la producción del árbol en función del diámetro de los frutos en los árboles de cuadro 5N1, en la temporada 2007-2008. Valores medios \pm Error estándar. *: Significativo al 5 %.

En la temporada 2008-2009, se observa una mayor producción en general y mayores proporciones de frutos chicos. Si bien en el cuadro 5N1, el tratamiento con urea presenta una distribución distinta a la del testigo (χ^2 según Pearson: 0,048), no se observan diferencias significativas en ninguna categoría de tamaño. De todas maneras, en el tratamiento con urea puede observarse una tendencia hacia los tamaños superiores (Figura 4.12)

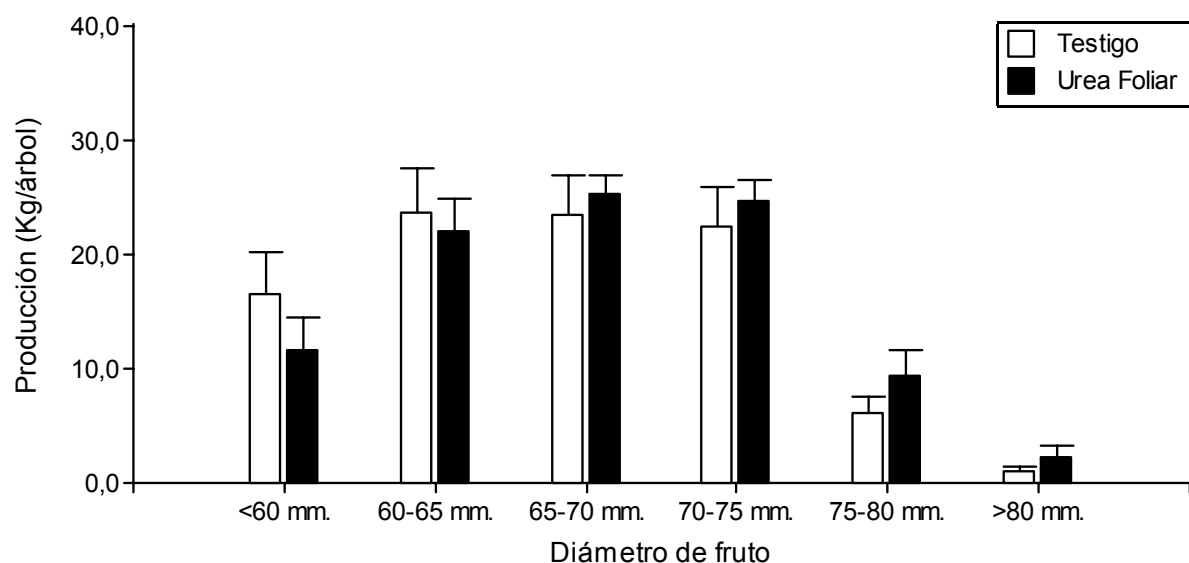


Figura 4.12 Distribución de la producción del árbol en función del diámetro de los frutos en los árboles de cuadro 5N1, en la temporada 2008-2009. Valores medios \pm Error estándar.

Por último, en el cuadro 5N4, el tratamiento con urea no presenta una distribución de la producción distinta a la del testigo (χ^2 según *Pearson*: 0,81). (Figura 4.13). Este resultado era previsible ya que en este cuadro, el tratamiento con urea no manifestó un efecto raleador consistente.

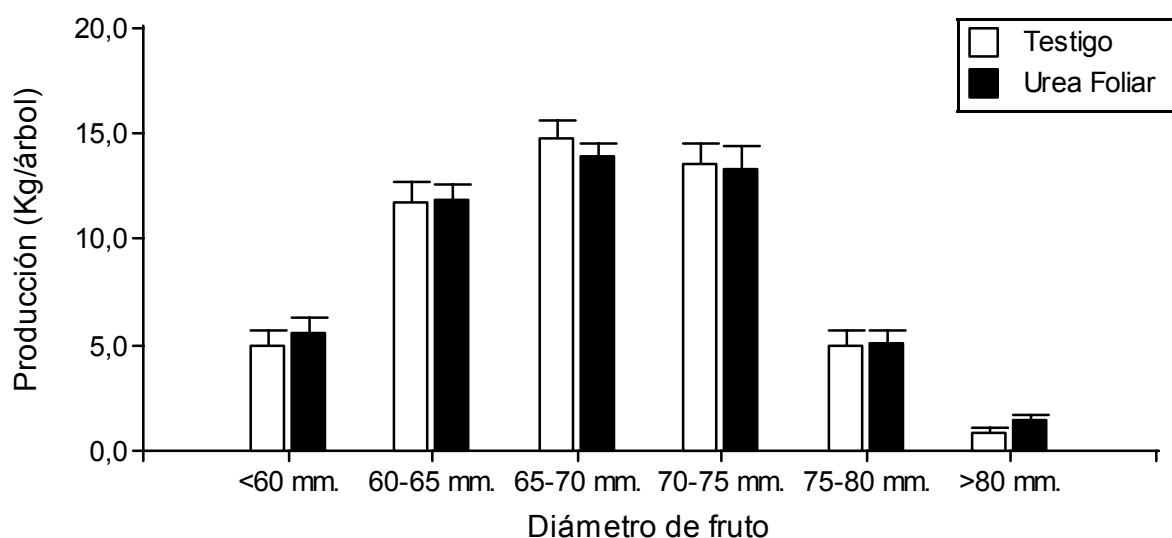


Figura 4.13 Distribución de la producción del árbol en función del diámetro de los frutos en los árboles de cuadro 5N4, en la temporada 2008-2009. Valores medios \pm Error estándar.

Para determinar el nivel de carga frutal óptimo para los árboles del cuadro 5N1 se realizó el análisis propuesto por Link (2000) en base a los datos de las tres cosechas. La producción de los árboles fue separada en tres categorías de tamaño de fruto, luego se clasificaron los árboles según el número de frutos cosechados y se graficó la relación entre estas variables.

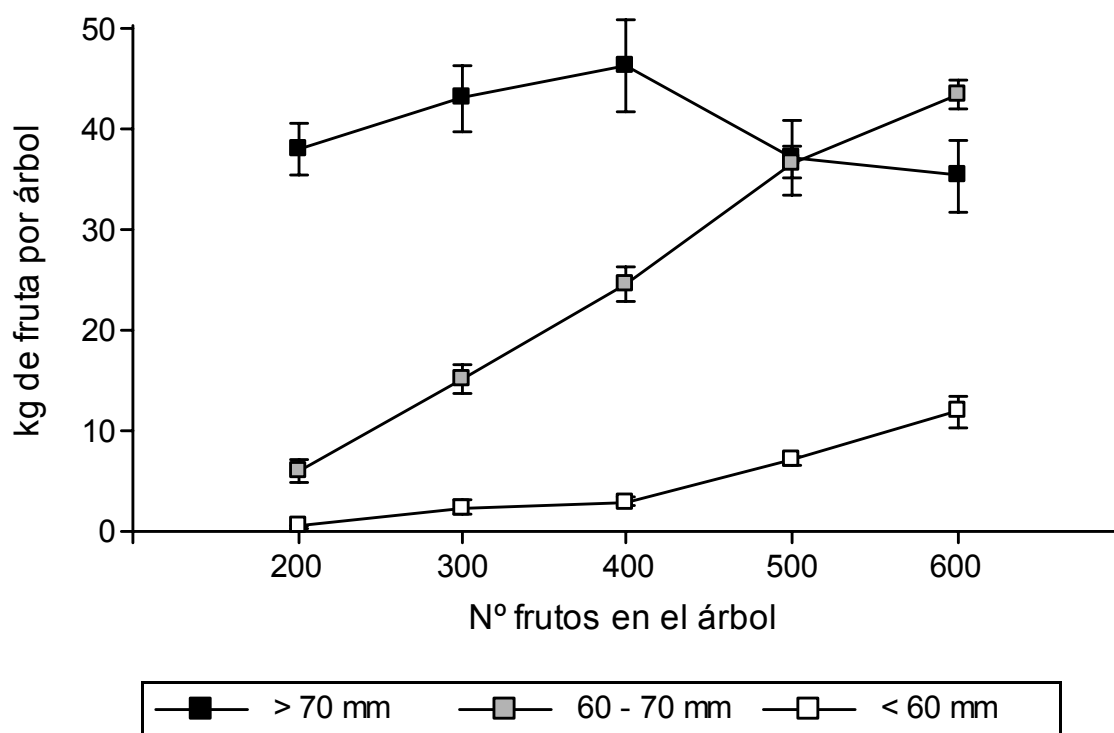


Figura 4.14 Rendimiento de perales cv. Williams (625 árboles por ha) en tres categorías de tamaño de fruto en relación con la carga frutal (número de frutos en el árbol). Datos de 60 árboles en 2007, 2008 y 2009. Valores medios \pm Error estándar.

En la figura 4.14 se observa claramente que el nivel adecuado de carga frutal para el cuadro 5N1 es de 400 frutos por árbol. Con niveles de 500-600 frutos por árbol, la excesiva competencia entre los frutos disminuye la producción de frutos grandes, incrementando fuertemente la producción de frutos chicos y medianos. Con niveles de 200-300 frutos por árbol se observa una situación de baja carga frutal, en la cual se desaprovecha la capacidad de la planta y la producción de frutos grandes también es inferior al máximo posible. Es interesante relacionar la información brindada por las figuras 4.9 y 4.14. Si bien niveles de carga de 200-300 frutos por árbol presentan mayores pesos medio de fruto (Figura 4.9), esto no se debe a una mayor producción de frutos grandes sino a una disminución en la producción de frutos medianos y chicos (Figura 4.14).

En las dos primeras temporadas, los árboles testigos presentaban entre 300 y 450 frutos en la cosecha. Es por esto que tanto el raleo manual en la primera temporada, como el tratamiento con urea en la segunda sólo manifestaron una menor cantidad de frutos chicos o medianos, sin lograr incrementos significativos de frutos grandes.

En los casos en los cuales el tratamiento resultó efectivo, **la aplicación foliar de urea sobre perales cv. Williams en plena floración generó un desplazamiento de la curva de producción hacia los mayores calibres de fruto y un pequeño incremento, entre 4 y 6 %, del peso medio de los frutos.**

4.3 Número y tamaño de células del fruto en la cosecha

El tamaño de las células del fruto fue similar en las tres cosechas (Tabla 4.6). El volumen celular de las peras *Williams* fue entre 1 y 3 $10^6 \mu\text{m}^3$. En manzanas, el volumen celular citado es 2-4 $10^6 \mu\text{m}^3$ (Westwood *et al.*, 1967, Goffinet *et al.* 1995). El diámetro celular medio de la pera *Williams* se encontraba entre 160 y 170 μm . En la cosecha de manzanas *Empire*, las células del fruto presentan un diámetro superior, entre 250 y 300 μm (Wisner *et al.*, 1995). Shargal *et al.* (2006) estimó menores diámetros celulares, entre 80 y 90 μm en peras cv. *Spadona*. En perales japoneses (*Pyrus pyrifolia* Nakai), Zhang *et al.* (2005^a, 2005^b, 2006, 2008) determinó valores de diámetro celular similares a los que hemos encontrado, entre 150 y 250 μm .

La relación entre el eje mayor y el eje menor refleja cuán alargadas son las células. En promedio, el eje mayor de las células de las pera cv. *Williams* era alrededor de 54 % más largo que el eje menor. Goffinet *et al.* (1995) reporta que este valor en manzana “*Empire*” es de alrededor de 28%. Por lo tanto, las células de las peras *Williams* tienen una forma más alargada que las células de las manzanas *Empire*.

Tabla 4.6 Diámetro y volumen celular de los frutos en las cosechas del cuadro 5N1

Temporada	Tratamientos	Diámetro celular medio (μm)	Volumen celular medio ($10^6 \mu\text{m}^3$)
2006-2007	Testigo	167,4	2,01
	Urea al 5%	164,6	1,89
		NS	NS
2007-2008	Testigo	170,2	2,02
	Urea al 5%	165,9	1,89
		NS	NS
2008-2009	Testigo	165,5	1,94
	Urea al 7,5%	163,0	1,83
		NS	NS

NS: Diferencias no significativas

La pulverización de urea sobre perales cv. *Williams* en plena floración no modificó significativamente el tamaño de las células de los frutos en el momento de la cosecha. En las tres cosechas, las peras provenientes de plantas pulverizadas presentaban un volumen celular medio 6 % menor al de las peras provenientes de plantas testigos.

En la segunda y tercer cosecha, las peras cv. *Williams* presentaron entre 80 y 100 millones de células (Tabla 4.7). En la primera cosecha se encontró un mayor número de células en los frutos (entre 110 y 120 millones). Wetswood *et al.* (1967) ya reportaron que las manzanas provenientes de árboles que florecieron extremadamente poco tenían muchas más células que aquellas provenientes de árboles con una floración estándar. Por lo tanto, la baja floración de los árboles en el 2006 se vuelve a reflejar en los resultados. No se han encontrado antecedentes de número de células en peras. En manzanas, Wetswood *et al.* (1967) han reportado valores similares (50-100 millones). Posteriormente, se han reportado valores inferiores en manzanas (30–70 millones); debido a que en estas estimaciones se descontó entre 30-35% al volumen del fruto por espacio intercelular (Goffinet *et al.*, 1995; Al Hinai *et al.* 2004).

Respecto al parámetro propuesto por Wismer *et al.* (1995), las peras cv *Williams* presentaron entre 130 y 160 capas celulares. En manzanas, este autor reporta un menor número de capas, entre 80 y 100. En tanto que en perales europeos y japoneses, los valores citados son muy similares: 100-300 capas. (Flaishman *et al.*, 2005; Shargal *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005^a, 2005^b, 2008) .

Tabla 4.7. Número de células y de capas celulares de frutos en las cosechas

Temporada	Tratamientos	Nº de células (10 ⁶)	Nº de capas en el mesocarpo
2006-2007	Testigo	114,2	157,4
	Urea al 5%	123,2	160,3
		NS	NS
2007-2008	Testigo	87,6	151,8
	Urea al 5%	101,6	153,4
		* *	NS
2008-2009	Testigo	89,8	134,5
	Urea al 7,5%	99,3	136,7
		*	NS

NS: No significativo. * y * *: Diferencia significativa al 5 y 1 %, respectivamente.

En las dos últimas temporadas, en las que la urea presentó un efecto raleador, las peras cosechas sobre árboles pulverizados presentaban entre 11-16 % más de células que las peras provenientes de árboles testigos. El incremento en el número de células en manzanas debido a distintos tipos de raleo temprano, fue mayor: entre 15 y 20 % en manzanos *Red Delicious*, entre 25 y 30 % en manzanos *Golden Delicious* (Westwood *et al.*, 1967) y entre 15 y 55% en manzanos *Empire* (Goffinet *et al.*, 1995).

En peras y manzanas, el desarrollo del fruto durante el periodo de división celular parece estar mantenido principalmente con carbono proveniente de las hojas de los dardos (Corelli Grappadelli *et al.*, 2007). En casos en los que el tratamiento con urea logra reducir el número de frutos presentes en el dardo, los frutos remanentes tienen la oportunidad de crecer con una mayor provisión de fotoasimilados y logran un mayor número de células.

Para evaluar la relación entre el número y el volumen de las células respecto al tamaño de fruto, cuantificado por medio de su peso, se realizaron dos diagramas de dispersión con los datos provenientes de los frutos cosechados en las tres temporadas (Figuras 4.15 y 4.16). Posteriormente se ajustaron dos regresiones lineales a estas relaciones, las cuales resultaron significativas, por lo cual tanto el número de células como el tamaño celular están relacionados significativamente con el tamaño final del fruto. A diferencia de Goffinet *et al.* (1995), la regresión cuadrática para el número de células no resultó significativa, por lo cual se concluye que en el rango que estamos evaluando, el aporte del número de células al tamaño del fruto no presenta limitaciones. A mayor número de células, mayor tamaño de fruto.

De acuerdo con Zhang *et al.*, (2006) la división celular parece ser más importante que el alargamiento celular en la determinación del tamaño final de la pera. En concordancia con esta aseveración, se observa que si bien los dos parámetros celulares (Número y volumen celular) presentaron un ajuste lineal significativo, el número de células manifestó un efecto mucho más marcado sobre el peso del fruto (Figuras 4.15 y 4.16). Incluso el coeficiente de determinación de la función entre el peso y el número de células fue mayor al de la función entre el peso y el volumen celular.

- Peso del fruto (g) = $128 + 0,607 \cdot N^{\circ} \text{ células } (10^6)$ $R^2: 0,26$
- Peso del fruto (g) = $165 + 14,2 \cdot \text{Volumen Celular } (10^6 \text{ um}^3)$ $R^2: 0,03$

Los valores de los coeficientes de determinación fueron bajos debido a que cada función incluía sólo uno de los dos factores que se relacionaba significativamente con el tamaño. La regresión entre el peso del fruto y los dos parámetros celulares en conjunto presentó un coeficiente de determinación mucho mayor ($R^2: 0,88$).

$$\text{Peso del fruto (g)} = -142 + 1,58 \cdot N^{\circ} \text{ células } (10^6) + 87,7 \cdot \text{Volumen Celular } (10^6 \text{ um}^3)$$

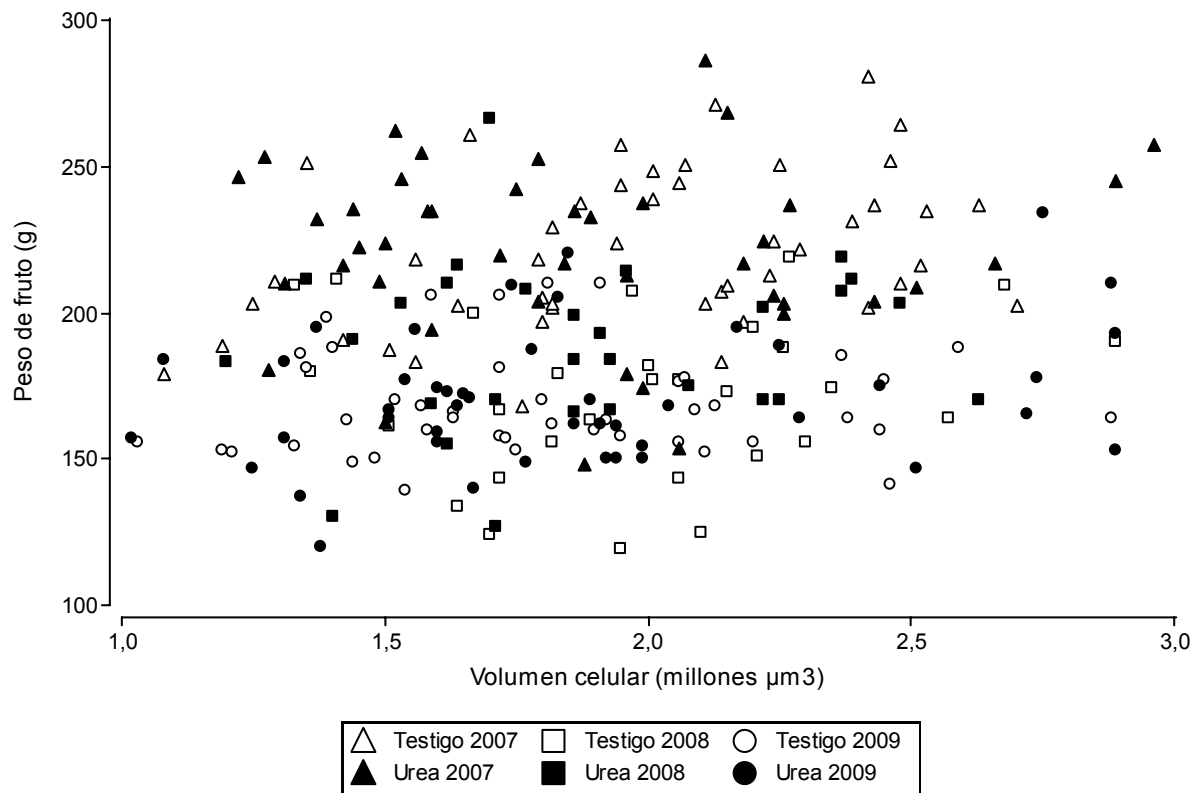


Figura 4.15: Relación entre el volumen celular ($10^6 \mu\text{m}^3$) y el peso del fruto (g) según: I. el tratamiento: testigos (símbolos blancos) y urea (símbolos negros) y II. el año de la cosecha: 2007 (triángulos), 2008 (cuadrados) y 2009 (círculos).

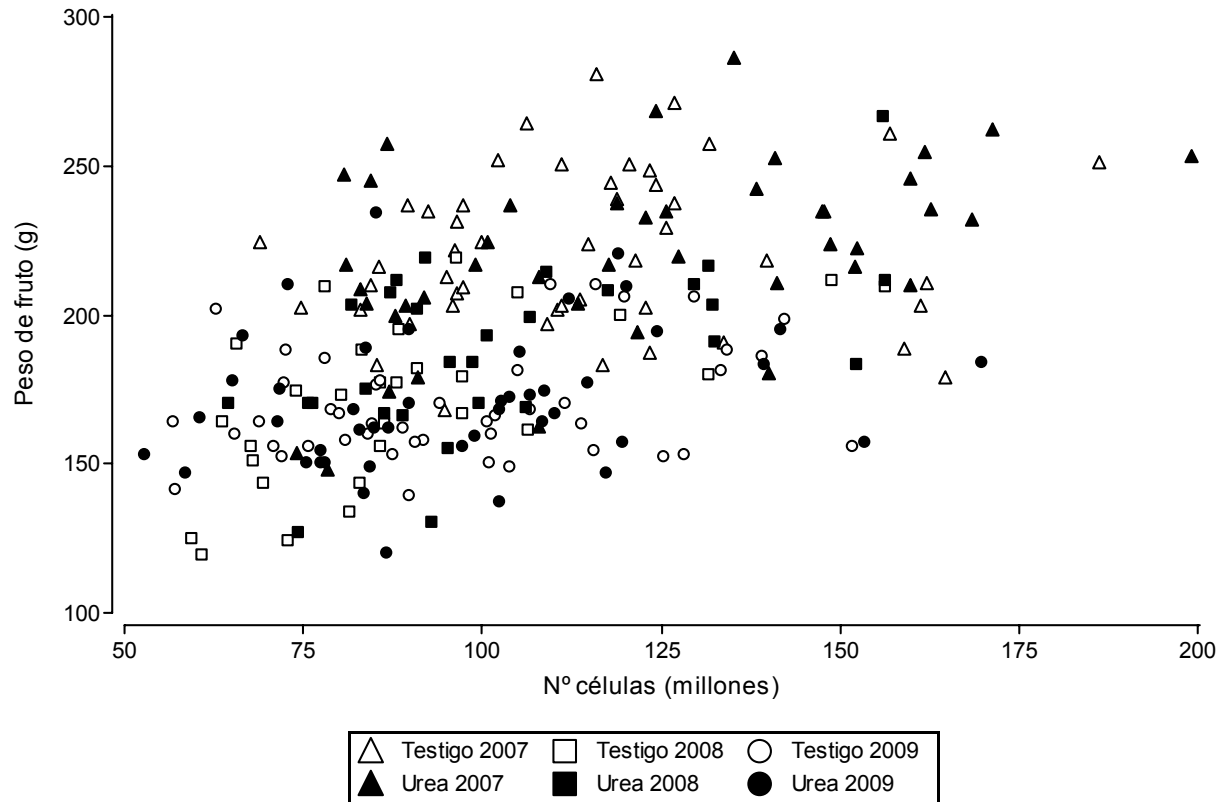


Figura 4.16: Relación entre el número de células (10^6) y el peso del fruto (g) según: I. el tratamiento: testigos (símbolos blancos) y urea (símbolos negros) y II. el año de la cosecha: 2007 (triángulos), 2008 (cuadrados) y 2009 (círculos).

La pera *Williams* es un fruto con capacidad partenocárpica, es decir, puede desarrollarse sin necesidad de tener semillas (Ryugo 1988). Sin embargo, la evaluación del número de semillas en el fruto en la cosecha puede resultar útil en dos aspectos: para determinar si la pulverización de urea en floración disminuye el número de semillas en los frutos y para evaluar el efecto del número de semillas sobre el tamaño del fruto y sus parámetros celulares.

En la temporada 2008-2009, los frutos cosechados en los árboles pulverizados con urea en floración presentaron 2,6 semillas en promedio, frente a 3,1 semillas de frutos provenientes de árboles testigos. **Esta disminución en el número de semillas de los frutos debido al tratamiento con urea es significativa (p-valor 0,042).** En 1963, Denne encontró una tendencia creciente en el número de células del fruto al incrementar el número de semillas en las manzanas. Posteriormente, Zhang *et al.* (2008) encontró que los frutos partenocárpicos en perales japoneses eran más chicos que los frutos polinizados, a pesar de presentar un mayor número de células. Los autores sugieren que las semillas estimulan de alguna manera la expansión celular en las peras japonesas.

Para analizar la relación entre la presencia de semillas en la pera *Williams* y los parámetros celulares se realizaron gráficos de puntos entre las variables en base a los datos de los 100 frutos evaluados en la cosecha 2009 (Figuras 4.17 y 4.18). En la figura 4.17 se observa que el número de semillas tuvo una influencia positiva sobre el número de células hasta la presencia de 2 semillas; a partir de allí, su influencia fue negativa, debido, tal vez, a un efecto competidor. En la figura 4.18 se observa un comportamiento contrario, el número de semillas presentó una influencia negativa sobre el volumen celular hasta la presencia de 3 semillas; a partir de allí, su influencia fue positiva. En definitiva, la relación entre estas variables no resultó tan clara como la manifestada por Denne (1963) o Zhang *et al.* (2008).

En definitiva, es interesante evaluar la relación entre el peso del fruto y el número de semillas presente, para lo cual se realizó un gráfico de puntos entre las variables (Figura 4.19) tomando como muestra 250 frutos de la cosecha 2009. Los frutos partenocárpicos, presentaron el peso medio (155 g) más bajo, similar a los frutos con una sola semilla. Los frutos que tenían entre 2 y 5 semillas presentaron un peso medio entre 164 y 168 g. Por último los frutos con más de 5 semillas, presentaron el peso medio más alto, de 173 g. En suma, la presencia de semillas tiene un efecto positivo sobre el tamaño del fruto, si bien al parecer pueden llegar a presentar patrones celulares distintos.

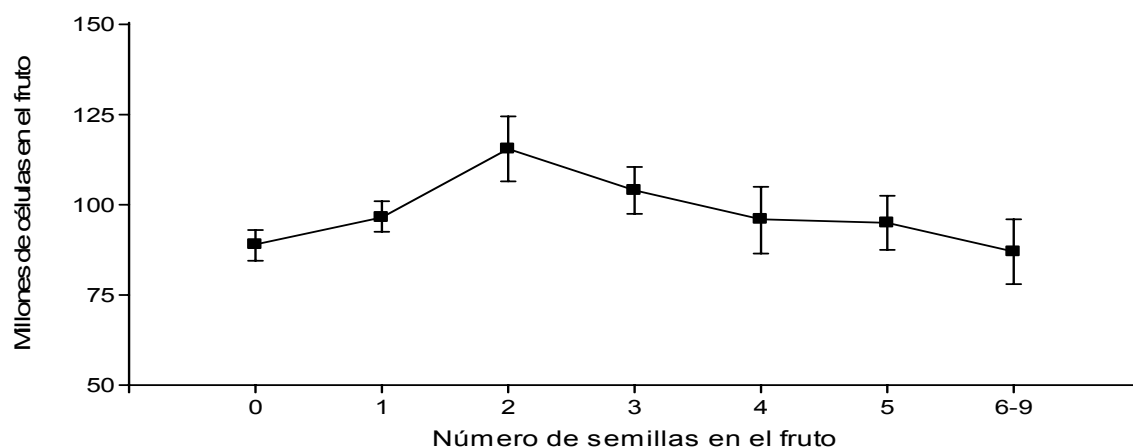


Figura 4.17. Relación entre el número de semillas y el número de células en peras cv Williams, en base a cien frutos del cuadro 5N1 cosechados en el 2009. Valores medios \pm error estándar.

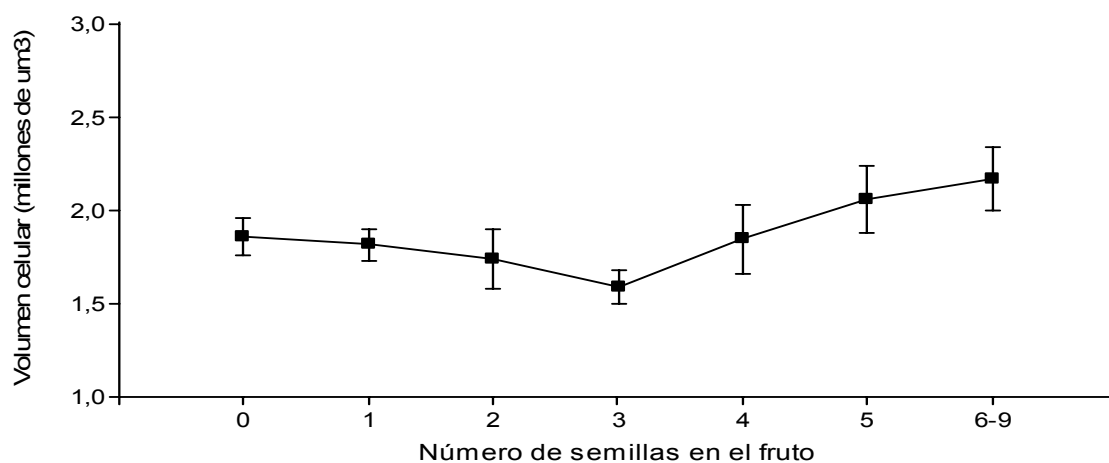


Figura 4.18. Relación entre el número de semillas y el volumen celular en peras cv Williams, en base a cien frutos del cuadro 5N1 cosechados en el 2009. Valores medios \pm error estándar.

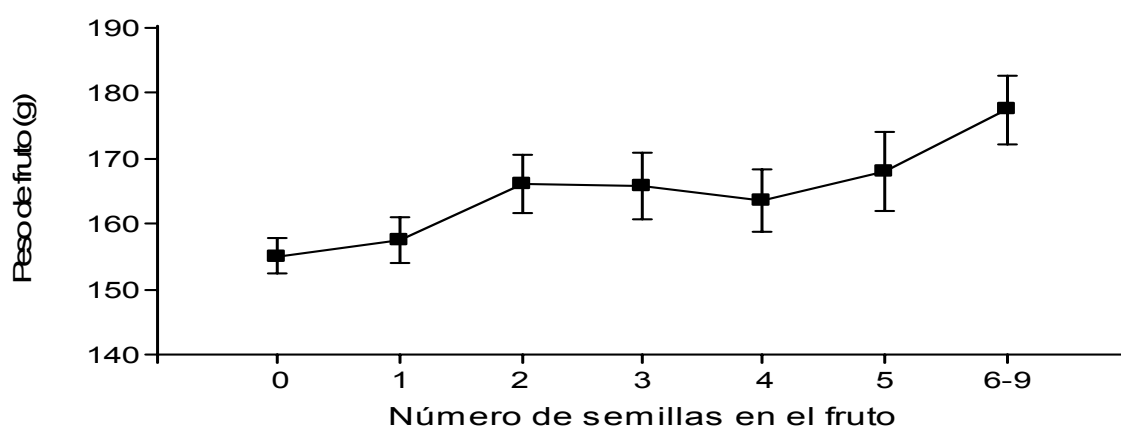


Figura 4.19. Relación entre el número de semillas y peso de peras cv Williams, en base a 250 frutos del cuadro 5N1 cosechados en el 2009. Valores medios \pm error estándar.

4.4 Destinos y partición del nitrógeno proveniente del fertilizante

Zimmer *et al.* (1996) y Handschack & Alexander (2002) mencionan que los manzanos pulverizados con urea en plena floración presentan una mayor concentración de nitrógeno en las hojas respecto a manzanos testigos. En concordancia con estos autores, **en perales cv. Williams pulverizados con urea al 5% en plena floración se observa un incremento en la concentración de nitrógeno en las hojas muestreadas luego de la cosecha, en el mes de Febrero (*p*-valor: 0,14) (Tabla 4.8).**

Tabla 4.8 Concentración foliar de Nitrógeno en perales cv. Williams en el mes de febrero

Tratamiento	Nitrógeno foliar (%)		
	2007	2008	2009
Testigo	2,12	2,13	2,06
Urea Foliar	2,21	2,20	2,16
	NS	NS	NS

NS: Diferencias no significativas.

Sin embargo, el incremento en el nitrógeno foliar en perales cv *Williams* fue del 4 %, un valor menor al reportado en manzanos: 8 % (Zimmer *et al.*, 1996) y 30 % (Handschack & Alexander, 2002). Este menor efecto nutricional logrado puede deberse a que las hojas de dardo de los perales se desarrollan más lentamente que las hojas de dardo de los manzanos (Nielsen *et al.*, 1997), por lo cual en el momento de la floración interceptan una menor cantidad de fertilizante.

Estos resultados nutricionales fueron evaluados sobre hojas en el mes de febrero, luego de la cosecha, momento habitual de toma de muestras foliares para realizar diagnósticos nutricionales. Para la evaluación del efecto nutricional de la aplicación de urea en plena floración en los primeros días luego de la floración, se realizaron muestreos en tres momentos: floración (2 días después de la aplicación, DDA), caída de pétalos (7 y 9 DDA) y cuaje de frutos (16 DDA). Las muestras consistían en dardos completos, cuyas características generales se presentan en la tabla 4.9.

En ambos años, los dardos muestreados presentaban entre 9 y 14 hojas y alrededor de 7 flores-frutos. (Tabla 4.9). En el 2008, los dardos eran más pequeños que en el 2006. Esto podría estar indicando que la pulverización fue realizada anticipadamente dentro del período de días en los cuales las plantas se hallaban en plena floración.

Tabla 4.9. Descripción general de los dardos muestreados.

Año	DDA	Tratamiento	Nº hojas	Nº flores-frutos	Peso Fresco (g)	Peso Seco (g)
2006	2	Testigo	13,5	7,5	3,02	0,64
		Urea foliar	10,7	7,8	3,19	0,56
			*	NS	NS	NS
	7	Testigo	12,6	7,3	4,47	1,00
		Urea foliar	10,7	7,0	4,97	1,04
			*	NS	NS	NS
	16	Testigo	11,9	2,0	8,00	1,66
		Urea foliar	11,6	2,0	8,37	1,68
			NS	NS	NS	NS
2008	2	Testigo	9,4	7,5	2,37	0,46
		Urea foliar	9,8	7,0	2,25	0,47
			NS	NS	NS	NS
	9	Testigo	12,9	6,9	3,96	0,79
		Urea foliar	14,3	6,7	4,74	0,95
			NS	NS	**	**

DDA: Días Después de la Aplicación de urea NS: Diferencia no significativa al 5%.

*, **: Diferencia significativa al 5 y 1% respectivamente

No se observan diferencias significativas en el número de frutos presentes en el dardo entre los tratamientos, por lo cual no se ve reflejado el efecto raleador de la aplicación de urea en plena floración. En el año 2006, los dardos presentaban sólo dos frutos a los 16 DDA debido a un raleo manual realizado a los 12 DDA.

El contenido de nitrógeno (mg) en hojas, flores y posteriormente frutos del peral cv. *Williams* manifestó un incremento sostenido en las dos experiencias realizadas (Figuras 4.20 y 4.21). Las hojas presentes en el dardo contenían entre 6 y 8 mg de N en floración, alrededor de 15 mg en caída de pétalos y superaban los 30 mg en el cuaje de fruto. Por su parte, las flores contenían entre 13 y 15 mg de N en floración y alrededor de 20 mg luego de la caída de pétalos. En el año 2006, no se observó un incremento en el contenido de nitrógeno de las flores-frutos entre los 7 y los 16 DDA debido al raleo manual realizado a los 12 DDA (Figura 4.20). El mismo patrón y similares valores mencionan Tagliavini *et al.* (1997) en un trabajo en el cual evalúan la fuente nitrogenada del crecimiento inicial de los perales cv. *Abbé Fetel* en la primavera.

Por tanto que la concentración de nitrógeno (%) en hojas, flores y posteriormente frutos presentó una disminución paulatina en ambas temporadas (Figuras 4.22 y 4.23). Las hojas presentaron entre 3,5 y 4 % de nitrógeno en floración y alrededor de 3% en el momento de fruto cuajado. Las flores presentaron entre 4 y 5 % de nitrógeno y los pequeños frutos cuajados contenían alrededor de 3 % de nitrógeno. Nuevamente, el mismo patrón y similares valores son reportados por Tagliavini *et al.* (1997) en perales cv. *Abbé Fetel*.

El tratamiento con urea en floración incrementó entre 20 y 40 % el porcentaje de nitrógeno en las flores a los 2 DDA. El incremento observado en las hojas fue menor: del 20 % en el 2006 y sólo un 5 % en el 2008. Esta diferencia ya no era significativa para el momento de caída de pétalos (7-9DDA) (Figuras 4.22 y 4.23). En el 2008, los dardos pulverizados presentaron un mayor contenido de nitrógeno en hojas y flores a los 2 DDA. Esta diferencia fue aún más pronunciada a los 9 DDA debido, en gran medida, al mayor peso de estos órganos en los dardos pulverizados (Figura 4.20).

No se han encontrado muchos trabajos que estudien el efecto sobre el contenido de nitrógeno en distintos tejidos logrado por la aplicación de urea en floración. En un trabajo en el cual se estudió la aplicación de urea al 6 % sobre palto (*Persea americana* Mill) se observó mayores concentraciones de nitrógeno en las inflorescencias pulverizadas (Zilkah *et al.*, 1987).

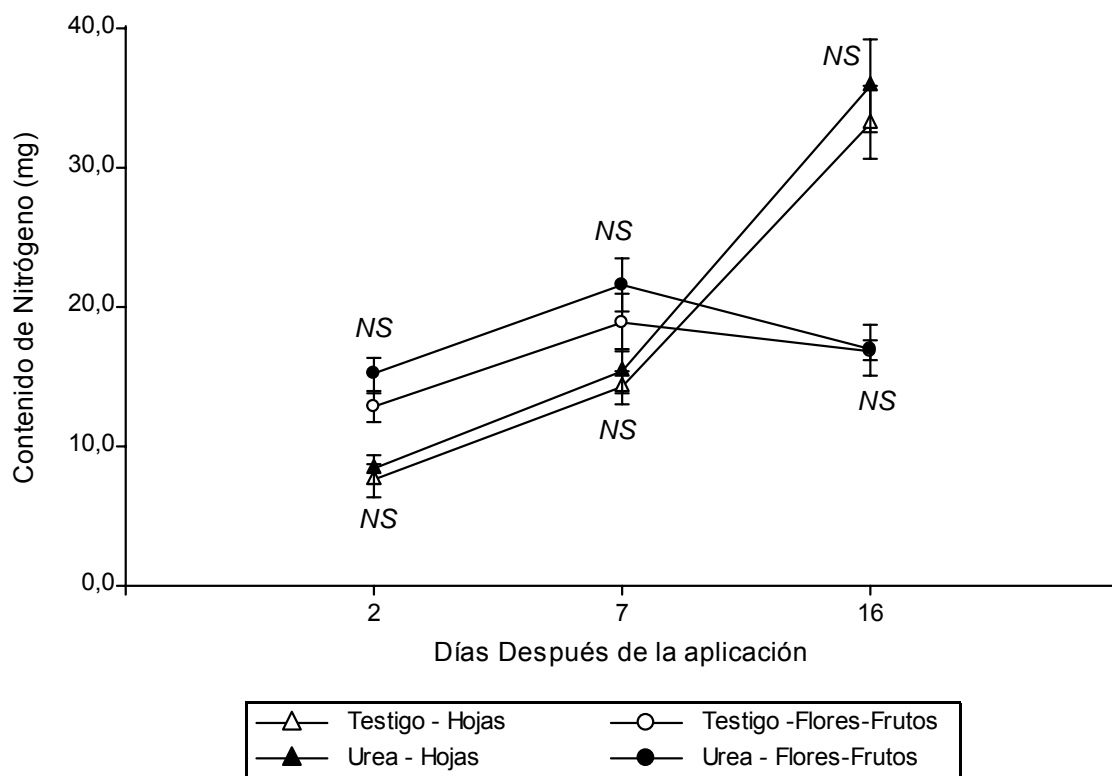


Figura 4.20. Contenido de nitrógeno en hojas (triángulos) y flores – frutos (círculos) provenientes de dardos testigos (símbolos blancos) y dardos pulverizados con urea al 5 % en plena floración (símbolos negros) en el año 2006. NS: Diferencia no significativa.

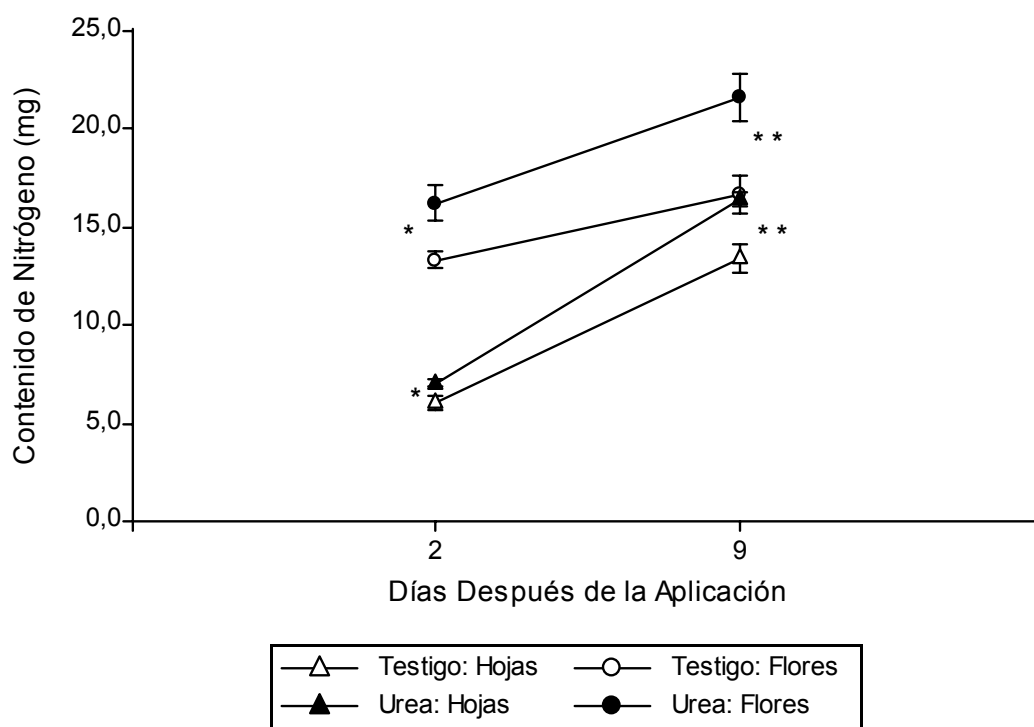


Figura 4.21. Contenido de nitrógeno en hojas (triángulos) y flores – frutos (círculos) provenientes de dardos testigos (símbolos blancos) y dardos pulverizados con urea al 5 % en plena floración (símbolos negros) en el año 2008. *, **: Diferencia significativa al 5 y 1 % respectivamente.

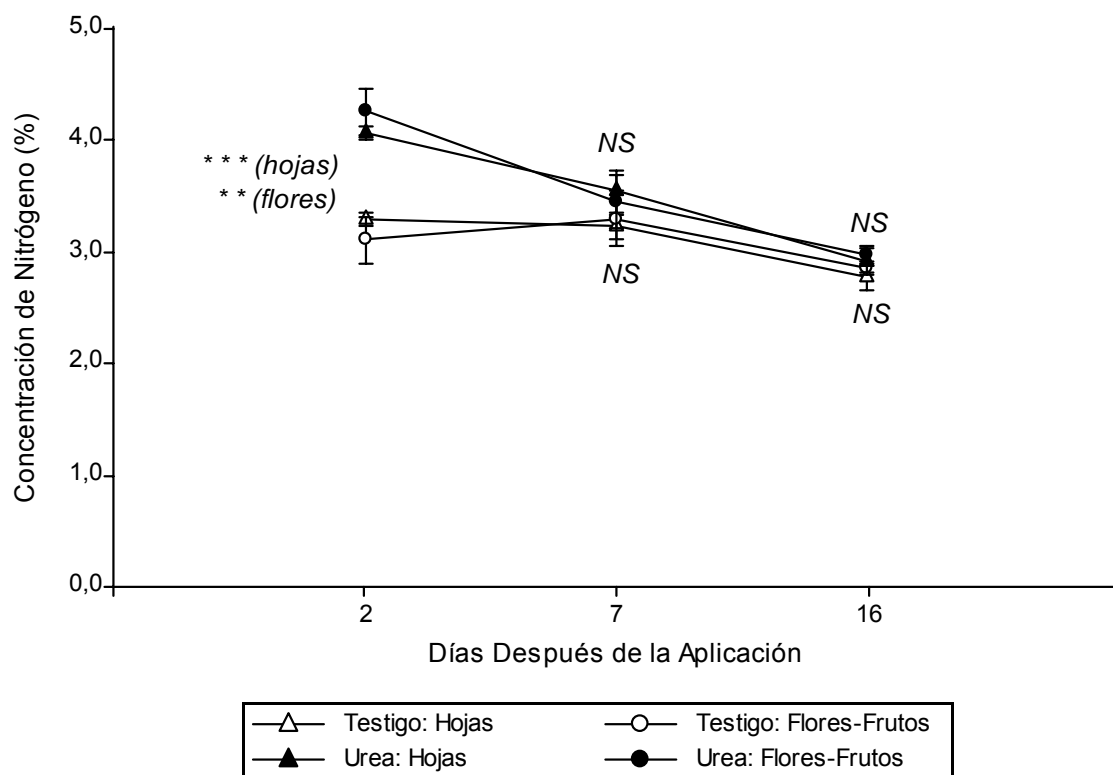


Figura 4.22. Concentración de nitrógeno en hojas (triángulos) y flores – frutos (círculos) provenientes de dardos testigos (símbolos blancos) y dardos pulverizados con urea al 5 % en plena floración (símbolos negros) en el año 2006. NS: Diferencia no significativa. **, ***: Diferencias significativas al 1 y 0,1 % respectivamente.

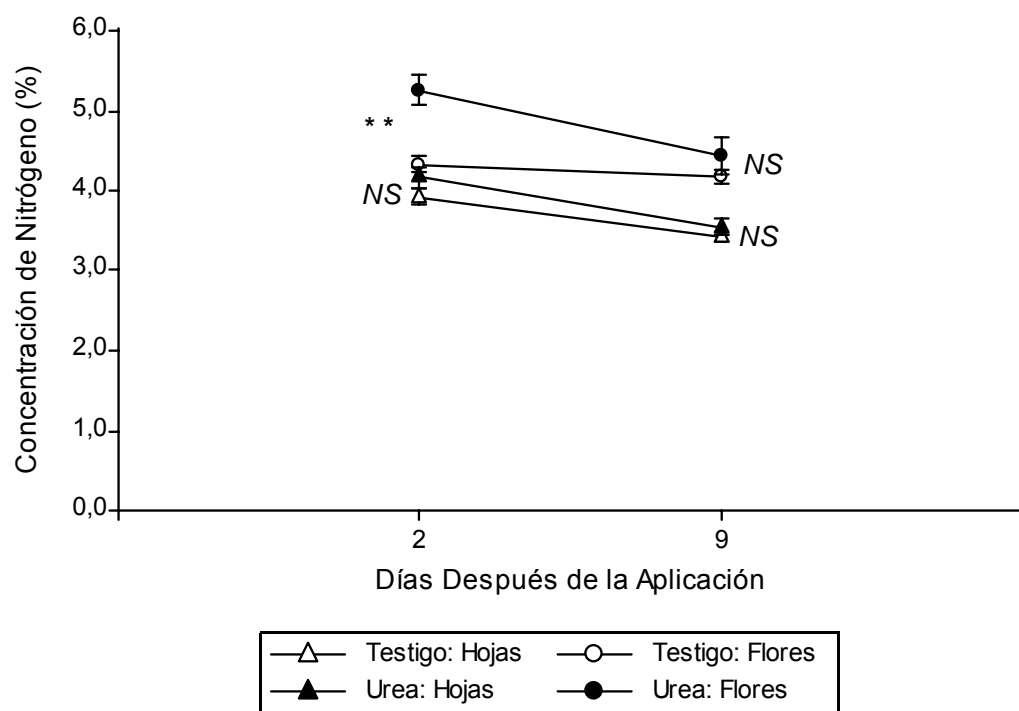


Figura 4.23. Concentración de nitrógeno en hojas (triángulos) y flores – frutos (círculos) provenientes de dardos testigos (símbolos blancos) y dardos pulverizados con urea al 5 % en plena floración (símbolos negros) en el año 2008. NS: Diferencia no significativa. **: Diferencia significativa al 1 %.

A los 2 DDA se encuentra la máxima concentración de Nitrógeno Proveniente de Fertilizante (NPF): entre 10 y 12 % en las flores y alrededor del 8 % en las hojas (Tabla 4.10). Sin bien en duraznero se menciona que la urea pulverizada culmina su absorción luego de 3 días (Furuya & Umemiya, 2002), es probable que en nuestros ensayos a los 2 DDA se haya logrado la mayor parte del máximo contenido posible de NPF en los tejidos pulverizados.

En la primavera, tanto las hojas como las flores y posteriores frutos se encuentran en activo crecimiento e incorporan rápidamente grandes cantidades de nitrógeno tal como puede observarse en las figuras 4.20 y 4.21. Esta es la razón por la cual el porcentaje de NPF decrece paulatinamente en caída de pétalos y al momento de fruto cuajado. En aplicaciones de urea al 2 % sobre manzanos cv. *Fuji* en floración, se encontró que luego de un mes, las hojas aplicadas presentaban 10 % NPF (Fallahi *et al.*, 2002).

Tabla 4.10. Contenido y concentración de Nitrógeno Proveniente del Fertilizante (NPF) en hojas, flores y frutos de perales cv Williams pulverizados con urea al 5 %.

Año	DDA	Hojas		Flores o frutos			Flor- fruto	Total
		NPF		NPF		Nº	NPF	NPF
		(%)	(mg)	(%)	(mg)		(mg)	(mg)
2006	2	8,0	0,72	10,1	1,57 b	7,8 b	0,20	2,28 b
	7	5,4	0,82	5,0	1,16 b	7,0 b	0,17	1,98 ab
	16	2,6	0,78	1,7	0,29 a	1,9 a	0,15	1,07 a
			NS		**	***	NS	*
2008	2	7,7	0,54	12,0	1,96	6,9	0,28	2,50
	9	4,4	0,72	5,3	1,19	6,7	0,17	1,91
			NS		NS	NS	NS	NS

DDA: Días después de la Aplicación. NPF: Nitrógeno Proveniente del Fertilizante.

NS: Diferencia no significativa al 5%. *,** y ***: Diferencia significativa al 5, 1 y 0,1 % respectivamente

El conjunto de hojas del dardo contenía en promedio entre 0,70 y 0,80 mg NPF. A los 2 DDA, cada flor presentaba en promedio entre 0,20 y 0,30 mg de NPF. Una buena parte de este nitrógeno se encontraba en los pétalos y por lo cual, luego de que se cayeran los mismos, las flores presentaban un valor algo menor, entre 0,15-0,17 mg NPF (no significativo estadísticamente).

Para determinar si el NPF incorporado en los tejidos permanece inmóvil se evaluó el contenido de NPF entre las distintas fechas muestreadas. El contenido de NPF en hoja y flor a los 2 DDA no difirió de manera significativa con el encontrado en los muestreos posteriores (Tabla 4.10). Esto podría estar indicando que **el nitrógeno proveniente del fertilizante en los órganos fue asimilado y utilizado en el mismo lugar en el cual fue absorbido.**

Las hojas del dardo son particularmente importantes debido a que son responsables de proveer los fotoasimilados necesarios para el crecimiento de los frutos durante el periodo de división celular (Tagliavini *et al.*, 1997; Taiz & Seiger, 2002; Corelli Grappadelli *et al.*, 2007). El peso seco por hoja fue de 25 - 35 mg en floración, 40 y 50 mg en caída de pétalos y alrededor de 60 mg en el cuaje de frutos. El área foliar fue de 3-5 cm² en floración, alrededor de 8 cm² en caída de pétalos y superior a 10 cm² en cuaje de frutos (Tabla 4.11). Similares valores de peso seco y área foliar reportan Tagliavini *et al.* (1997) en perales cv *Abbé Fetel*.

Tabla 4.11. Tamaño de hoja y del conjunto de hojas de dardos de perales cv. Williams

Año	DDA	Tratamiento	Total de hojas			Área específica (cm ² .g ⁻¹ PS)	Hoja expandida		
			AF (cm ²)	PF (g)	PS (g)		AF (cm ²)	PF (mg)	PS (mg)
2006	2	Testigo	30,5	0,86	0,23	134	3,0	89	22,9
		Urea foliar	34,3	0,92	0,21	169	4,9	135	30,3
			NS	NS	NS	**	***	***	***
	7	Testigo	75,7	1,58	0,44	177	7,8	161	44,7
		Urea foliar	74,0	1,51	0,43	172	8,5	175	49,7
			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	16	Testigo	137,7	3,10	0,77	180	11,4	257	64,2
		Urea foliar	129,6	3,00	0,75	175	10,9	252	63,1
			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
2008	2	Testigo	18,5	0,61	0,15	119	4,0	136	34,0
		Urea foliar	18,6	0,63	0,17	112	4,1	138	37,5
			NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
	9	Testigo	71,7	1,69	0,39	182	7,7	186	42,7
		Urea foliar	82,9	2,04	0,46	179	8,3	206	46,9
			*	*	*	NS	NS	NS	NS

DDA: Días después de la Aplicación. AF: Área Foliar. PF: Peso Fresco. PS: Peso Seco.

NS: Diferencia no significativa al 5%. *, ** y ***: Diferencia significativa al 5, 1 y 0,1 % respectivamente

En el 2006, a los 2 DDA, los dardos pulverizados presentaron hojas más grandes que las hojas de los dardos testigos (+32% PS, +52% PF y + 63% AF) (Tabla 4.11). A los 7 DDA, ya no se observó esta diferencia. En este año, la pulverización de urea en floración permitió que las hojas de los dardos se expandieran más rápidamente. De hecho, las hojas de los dardos pulverizados presentaron más precozmente valores de área específica similares a los finales (170-180 cm²/g PS). En el año 2008 no se ha observado este fenómeno, pero el conjunto de hojas de los dardos pulverizados fue mayor al de los dardos testigos a los 9 DDA debido a aumentos no significativos en el número de hojas y el tamaño individual de cada hoja.

El tratamiento con urea en floración incrementó el peso de los pequeños frutos a partir de la segunda fecha muestreada (7DDA en el año 2006 y 9 DDA en el 2008) (Figuras 4.24 y 4.25). En el 2006, los incrementos observados fueron del 14% en el peso seco y 24 % en el peso fresco. En el 2008, los incrementos fueron superiores: 25 % en el peso seco y 23 % en el peso fresco. En la tercer fecha muestreada (realizada sólo en el 2006), esta tendencia se mantuvo (+14% PS y + 18% PF). Zilkah *et al.* (1988) también encontraron que la pulverización de urea en floración lograba incrementos en el peso de los pequeños frutos en durazneros y nectarines en tan sólo una o dos semanas luego de la aplicación.

Es importante destacar que los dardos pulverizados presentaron frutos más grandes aún cuando no se observaban diferencias significativas en el número de frutos en el dardo entre los tratamientos (Tabla 4.9). **La aplicación de urea en plena floración incrementa el tamaño de los frutos en los primeros días, independientemente de su efecto raleador.** Zimmer *et al.* (1996) menciona algo parecido en manzano: el autor encuentra un aumento marcado en el tamaño del fruto, a pesar de que esta práctica no había generado un efecto raleador significativo.

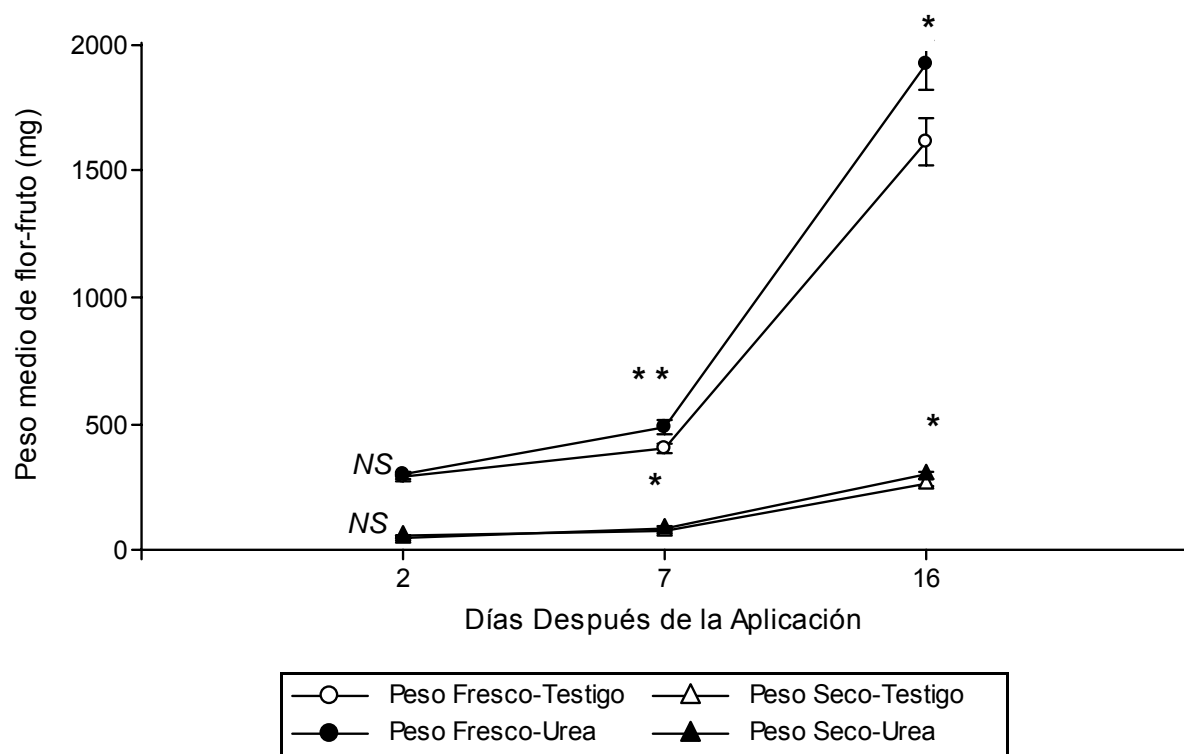


Figura 4.24. Peso fresco (círculos) y seco (triángulos) de flor – fruto en dardos testigos (símbolos blancos) o dardos pulverizados con urea al 5% en plena floración (símbolos negros). Año 2006. Valores medios \pm Error estándar. NS: Diferencia no significativa. *, **: Diferencias significativas al 5 y 1 %, respectivamente.

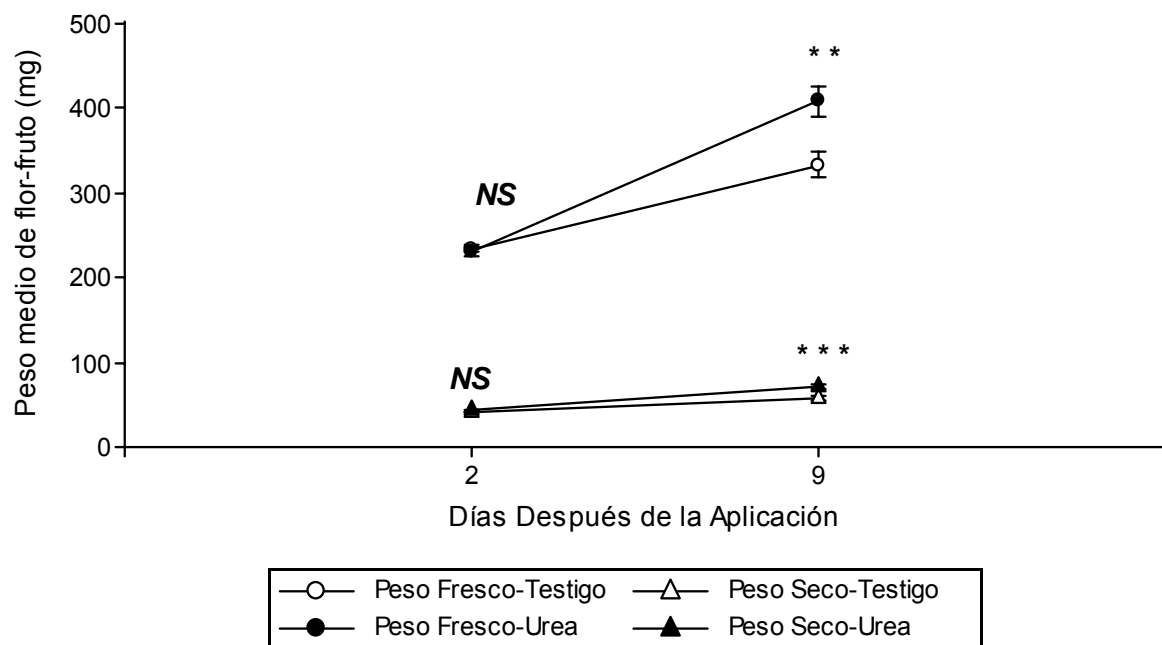


Figura 4.25. Peso fresco (círculos) y seco (triángulos) de flor – fruto en dardos testigos (símbolos blancos) o dardos pulverizados con urea al 5% en plena floración (símbolos negros). Año 2008. Valores medios \pm Error estándar. NS: Diferencia no significativa. **, ***: Diferencias significativas al 1 y 0,1 %, respectivamente.

En definitiva, respecto al **efecto nutricional** generado por la aplicación de urea al 5% sobre perales cv. Williams en plena floración, se encontró:

- Un incremento del 4 % en la concentración foliar de nitrógeno luego de la cosecha, inferior al reportado en manzanos.
- El ingreso de 0,20-0,30 mg de Nitrógeno Proveniente del Fertilizante en cada flor luego de 2 días. Estos valores representan entre 10 y 12 % del N presente en las flores.
- La incorporación de 0,70-0,80 mg de Nitrógeno Proveniente del Fertilizante en el conjunto de hojas del dardo, lo cual representan alrededor del 8% del N total.
- Un incremento de 20 - 40 % en la concentración de nitrógeno en las flores
- Un incremento en la concentración de nitrógeno de las hojas (5-20 %) en la floración.
- Un mayor tamaño o, al menos, una expansión más rápida de las hojas del dardo, responsables de sostener el crecimiento inicial de los frutos.
- Un aumento entre un 15 y 25 % del peso de los pequeños frutos a partir de los 7 días después de plena floración, antes de que el tratamiento logre generar una caída de frutos.

4.5 Daño oxidativo en hojas debido a la aplicación foliar de urea

En manzanos, se observan severas necrosis foliares días después de aplicar altas concentraciones de urea en floración (Link, 2000; Wertheim, 2000). En aplicaciones de urea sobre perales en poscosecha, también se observa necrosis en los márgenes de las hojas (Sánchez *et al.*, 1990^a). Sin embargo, en nuestros ensayos, la aplicación de urea al 5% en el momento de plena floración, no manifestó ningún efecto visible sobre las hojas de los perales. Las hojas de dardo del peral se expanden más lentamente que las hojas del manzano (Nielsen *et al.*, 1997), por lo cual en floración se encuentran menos expuestas a la aplicación y es posible que intercepten una menor cantidad de fertilizante.

En aplicaciones foliares, la urea es degradada en el citoplasma generando amonio, el cual es incorporado inmediatamente a un aminoácido (Witte *et al.*, 2002; Wang W. *et al.*, 2008). Cuando la planta no logra incorporar con suficiente rapidez el amonio, éste se acumula en las hojas en grandes cantidades. El amonio es un producto tóxico y puede generar síntomas de toxicidad en las plantas (Britto & Krozucker, 2002).

La implicancia de las especies reactivas del oxígeno (EAO) durante el estrés producido por amonio no ha sido caracterizada completamente (Domínguez-Valdivia *et al.*, 2008); pero hay antecedentes de que altos contenidos de amonio en las hojas incrementaron los niveles de EAO (Zhu *et al.*, 2000; Wang C. *et al.*, 2008). Niveles altos de EAO generan un estrés oxidativo (Davies, 1987; Mittler, 2002; Møller *et al.*, 2007) y un indicador del estrés oxidativo ampliamente utilizado es el malóndialdehído (MDA) (Hodges *et al.*, 1999; Del Río *et al.*, 2005).

La técnica original de medición del MDA (Heath & Packer, 1968) ha sido corregida debido a la presencia de interferencias de azúcares, más específicamente sacarosa y fructosa (Du & Bramlage, 1992) y antocianinas (Hodges *et al.*, 1999). En el 2001, Taulavuori *et al.* estudiaron las diferencias entre las técnicas propuestas sobre hojas de arándano a lo largo del año. Los autores encontraron que en el otoño, la interferencia es máxima debido a la presencia de azúcares y antocianinas. En base a las hojas muestreadas, se decidió evaluar también estas interferencias en perales, otra especie perenne (resultados en el anexo).

Para evaluar el estrés oxidativo generado por esta práctica, se determinó el contenido de MDA en hojas 24 horas después de la pulverización con urea en comparación con hojas testigos, en dos momentos: plena floración y fines del verano (Figuras 4.26 y 4.27). Se realizó un análisis de varianza bifactorial y la interacción entre estos dos factores resultó significativa, por lo cual el tratamiento con urea modifica el contenido de MDA en las hojas según el momento del año en el cual es aplicado.

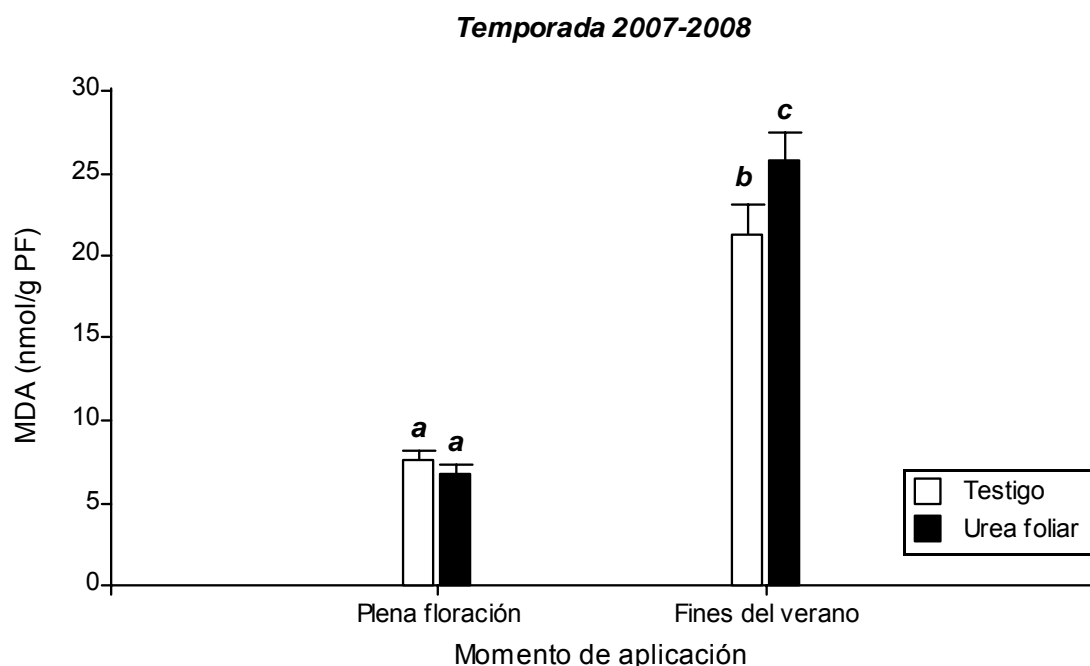


Figura 4.26. Contenido de malóndialdehído (MDA) por peso fresco (PF) de hojas de peral cv. Williams testigo (barras blancas) a 24 horas después de pulverizar urea al 5 % (barras negras) en dos momentos: plena floración y fines del verano (principios de marzo) de la temporada 2007-2008. Letras iguales no difieren estadísticamente según LSD Fisher.

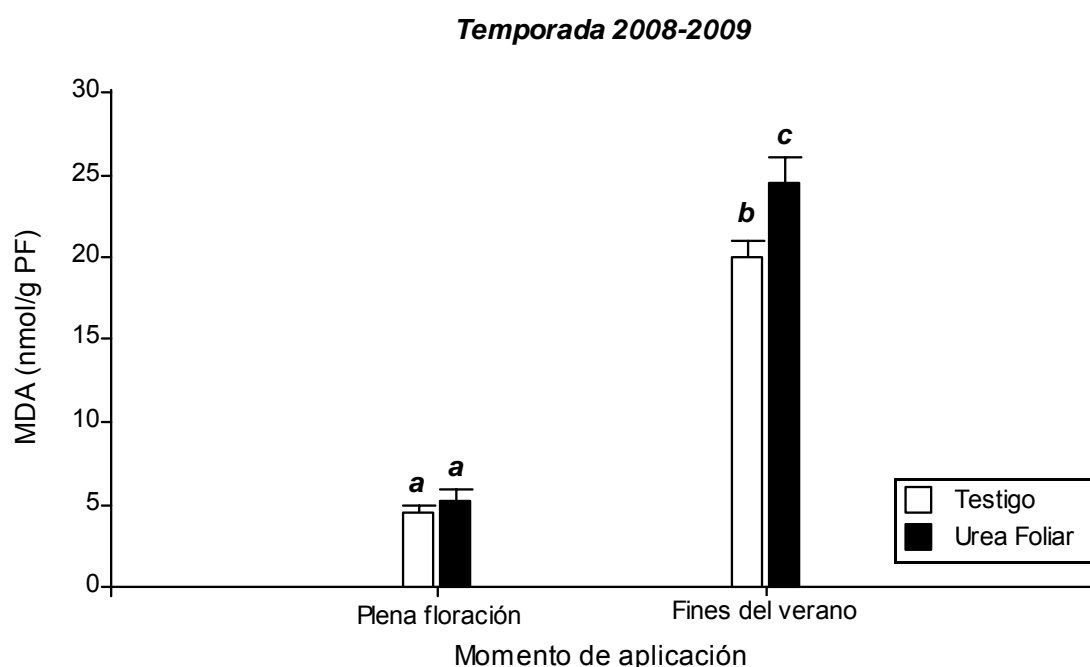


Figura 4.27. Contenido de malóndialdehído (MDA) por peso fresco (PF) de hojas de peral cv. Williams testigo (barras blancas) a 24 horas después de pulverizar urea al 5 % (barras negras) en dos momentos: plena floración y fines del verano (principios de marzo) de la temporada 2008-2009. Letras iguales no difieren estadísticamente según LSD Fisher.

A fines del verano (principios de Marzo), las hojas de dardos pulverizados con urea al 5 % presentaban un mayor contenido de MDA que las hojas de dardos testigos en las dos temporadas evaluadas (Figuras 4.26 y 4.27). La diferencia en el contenido de MDA fue del 24 % en la primera temporada y del 20 % en la segunda temporada. **Esto estaría indicando que la aplicación de urea a finales del verano genera un estrés oxidativo en las hojas y confirmaría la implicancia de éste en la toxicidad generada por esta práctica.**

Por el contrario, en plena floración en las dos temporadas evaluadas, las hojas de dardos pulverizados con urea al 5 % presentaron contenidos similares de MDA que las hojas de dardos testigos (Figuras 4.26 y 4.27). Esto estaría indicando que, **si bien la pulverización de urea tiene la capacidad de generar un estrés oxidativo en las hojas, cuando la misma es realizada en plena floración no causa daño oxidativo.**

Esta diferencia en la sensibilidad de los perales en función de la época en la cual la urea es pulverizada puede tener varias causas. En primera medida, en plena floración, la superficie foliar presente para interceptar la solución del fertilizante es mucho menor por lo cual la captación y absorción de la urea es menor. Además en la primavera las hojas de los dardos se encuentran en activo crecimiento y presentan una intensa actividad metabólica debido a la síntesis de componentes celulares, principalmente proteínas estructurales; por lo cual tienen la posibilidad de asimilar el amonio más fácilmente que una hoja madura a fines del verano, en la cual la principal actividad es la fotosíntesis.

5 CONCLUSIONES

5.1 Respuesta a las hipótesis planteadas

5.1.1 Efecto raleador de la aplicación foliar de urea en plena floración

La aplicación foliar de urea en altas concentraciones (5-7,5%) sobre perales cv. *Williams* en plena floración puede tener un **efecto raleador** pero esto no ocurre siempre y se desconoce las razones que expliquen esta respuesta diferencial. En los casos en los que el tratamiento actúa como un raleador temprano, logra disminuir la competencia por fotoasimilados durante el periodo de división celular de los frutos. Esto permite alcanzar un mayor número de células en los frutos y genera un mayor tamaño de fruto en la cosecha.

5.1.2 Efecto nutricional de la aplicación foliar de urea en plena floración

Respecto al **efecto nutricional** de la aplicación de urea al 5% sobre perales cv. *Williams* en plena floración, el tratamiento logra incrementar la concentración de nitrógeno en las hojas y las flores; estimula el desarrollo de las hojas del dardo e incrementa el peso de los pequeños frutos a partir de los siete días después de plena floración, antes de que el tratamiento logre generar una caída de frutos.

Respecto a la evaluación del **daño oxidativo** en hojas de perales cv. *Williams* generado por la pulverización de urea al 5 % se puede afirmar que si bien esta práctica tiene la capacidad de generar daño oxidativo hacia finales del verano, las aplicaciones en plena floración no causan daño oxidativo en las hojas

5.2 Aplicaciones prácticas

La pulverización de urea en plena floración es una herramienta útil para incrementar el tamaño de las peras cv. *Williams* en la cosecha. La decisión respecto a la conveniencia de su realización, debe ser tomada en función de la relación costo / beneficio, en base al precio del fertilizante, el costo de la aplicación y el valor de la producción en función del tamaño de fruto logrado.

5.3 Otros conocimientos generados

Para un monte de 30 años de edad de perales cv. *Williams* sobre pie franco en un marco de plantación de 4 x 4 m, se estableció: (I) la necesidad de contar con, al menos 50 hojas, para proveer fotoasimilados adecuadamente a los frutos y (II) que para lograr la máxima producción de frutos grandes, el nivel de carga debe ser de alrededor de 400 frutos por árbol.

Se estableció que en el momento de la cosecha, las peras cv. *Williams* presentaron entre 80 y 100 millones de células, y excepcionalmente alcanzan las 120 millones de células en años con muy baja densidad de floración. Las células tienen entre 160 - 170 μm de diámetro y un volumen entre 1-3 millones de μm^3 . La forma de las células es alargada y el eje mayor es 54 % más largo que el eje menor. Tanto el número de células como el volumen celular están relacionados significativamente con el tamaño del fruto, si bien el primer parámetro celular tiene un mayor efecto.

5.4 Perspectivas

Queda aún por esclarecer las razones que determinan el éxito o el fracaso de este tratamiento en el raleo logrado en perales cv. *Williams*. Entre los factores pueden encontrarse: la edad y/o la carga frutal de los árboles y las condiciones ambientales en el momento de aplicación (temperatura y humedad relativa).

Otras líneas interesantes para continuar investigando son:

1. El efecto del tratamiento con urea sobre la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico
2. Determinar si la aplicación de urea genera una mayor emisión de etileno desde las flores y las hojas del dardo en los perales cv. *Williams*, tal como fue observado en manzanos.
3. El efecto de la combinación de urea y benciladenina sobre la caída de frutos y el tamaño de los frutos de perales cv. *Williams* en la cosecha.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Al-Hinai Y. K. & Roper T. 2004. Rootstock effects on growth, cell number and cell size of Gala apples. *Journal of American Horticultural Science* 129:37-41
- Altube H. A., Santinoni L. A. & Alem H. J. 2007. Introducción a la fruticultura. En: Árboles frutales: Ecofisiología, Cultivo y aprovechamiento. Sozzy G. O. (ed.) Buenos Aires, Argentina. pp. 3-38.
- Apel K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species, metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Arbona V., Hossain Z., López-Climent M. F., Pérez-Clemente R. M. & Gómez-Cadenas A. 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to water logging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum* 132: 452–466.
- Asada K. 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology* 141: 391–396.
- Ballester M. 1996. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Medicina clínica (Barcelona)* 107: 509-515.
- Bangerth F. 2000. Abscission and thinning of young fruits and their regulation by plant hormones and bioregulators. *Plant Growth Regulation* 31: 43-59.
- Barattà B., Caruso T., Crescimanno P. L. & Inglese P. 1990. Using urea as thinning agent in olive: the influence of concentration and time of application. *Acta Horticulturae (ISHS)* 286: 163-166
- Basak A. 1993. The search for safer technologies of apple fruitlets thinning. *Acta Horticulturae (ISHS)* 329:240-242.
- Bendixen R., Jerendás J., Schinner K., Sattelmacher B & Hansen U-P. 2001. Difference in zeaxanthin formation in nitrate- and ammonium – grown *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 111: 255-261.
- Benítez C. E. 2001. Cosecha y poscosecha de peras y manzanas en los valles irrigados de la patagonia. EEA Alto Valle. INTA. General Roca- Argentina. 126 pp.
- Benítez C. E., Castro H. R., Ricca A. P. & Vaudagna S. R. 2005. PERAS Y MANZANAS: Factores que afectan la calidad de los frutos. Buenos Aires. Ediciones INTA. Buenos Aires-Argentina. 396 p.
- Bergh O. 1990. Effect of time of hand thinning on apple fruit size. *South African Journal of Plant and Soil* 7:1-10.
- Bertelsen M. G. 2002. Benzyladenine and other thinning agents for pear cv. “Clara Frijs”. *Journal of the American Pomological Society*. 56: 149-155.
- Bibby J. M. & Hukins D. W. L. 1992. Measurement of pH to quantify urease activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 25: 231-236.

- Bokov A., Chaudhuri A & Richardson A. 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanism of Aging and Development* 125: 811-826.
- Boltshauser V., Villarreal P., Avellá B., Mauricio B., Romagnoli S., Viñuela M. & Zunino N. 2007. Área irrigada de la provincia de Río Negro. Caracterización socio-económica y técnico productiva. Convenio Secretaría de fruticultura de Río Negro - INTA EEA Alto Valle. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 38 pp.
- Bound S. A. & Mitchell L. 2000. A new post-bloom thinning agent for *Packham's Triumph* pear. *Acta Horticulturae* 596.
- Bramardi S. J. 1995. Modelos de predicción de tamaño de frutos a la cosecha en base a mediciones sucesivas durante el periodo de crecimiento. *Magíster Scientia thesis*. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Bramardi S. J., Castro H. R., Zanelli M. L. 1998. Fruit growth pattern of pear cv. *Bartlett* and *Packhams Triumph* to improve hand thinning. *Proc. VII International Symposium on Pear Growing. Acta Horticulturae (ISHS)* 475.
- Britto D. T., Siddiqi M. Y., Glass A. D. M., & Kronzucker H. J. 2001^a. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 4255-4258.
- Britto D. T., Glass A. D. M., Kronzucker H. J. & Siddiqi M. Y. 2001^b. Cytosolic concentrations and transmembrane fluxes of $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. An evaluation of recent proposal. *Plant Physiology* 125: 523-526.
- Britto D. T. & Kronzucker H. J. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 159: 567-584.
- Castro H. R. 1992. Control del crecimiento y del desarrollo de frutales utilizando reguladores de crecimiento. *Rivista di agricoltura subtropicale e tropicale. Trimestrale Anno LXXXVI* 2.
- Censo Provincial de Agricultura Bajo Riego de la Provincia de Río Negro (Versión preliminar) 2005. Secretaría de Agricultura de la Provincia de Río Negro.
- Cheng L., Ma F & Ranwala D. 2004. Nitrogen storage and its interaction with carbohydrates of young apple trees in response to nitrogen supply. *Tree physiology* 24: 91-98.
- Consejo Federal de inversiones- Provincia de Río negro. CRPN INTA EEA Alto Valle. CIRN INTA Instituto de suelos. 2008. Estudio del impacto de la producción agrícola sobre la calidad de los suelos del Alto Valle del Río negro. Informe de avance. Área piloto 1.
- Corelli Grappadelli L., Tagliavini M. & Tonon G. 2007. Fisiologia dell'albero e dell'ecosistema frutteto. First symposium on horticultura in Europe. Viena. Book of abstracts.
- Costa G., Dal Cin V. & Ramina A. 2006. Physiological, molecular and practical aspects of fruit abscission. *Acta Horticulturae (ISHS)* 727: 301-310
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu V., Inzé D & Van Breusegem F.V. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779-795.
- Davies K. J. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *Journal of Biological Chemistry* 262: 9895-9901.

- Del Río, D, Stewart A.J. & Pellegrini N. 2005. A review of recent studies on malon di aldehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 15: 316-328.
- Denne M. P. 1960. The growth of apple fruitlets and the effect of early thinning on fruit development. *Annals of Botany N.S.* 24: 397-406.
- Denne M. P. 1963. Fruit development and some tree factors affecting it. *New Zealand Journal of Botany* 1:265-294.
- Dennis F. G. Jr. 2000. The history of fruit thinning. *Plant Growth Regulation* 31:1-16.
- Dominguez-Valdivia M. D., Aparicio-Tejo, P. M. Lamsfus C., Cruz C., Martin-Loucao M. A. & Morán J. F. 2008. Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in Ammonium -tolerant and -sensitive plants. *Physiologia Plantarum* 132: 359–369.
- Drath M. Kloft N, Batschauer A Marin K, Novak J & Forschhammer K. 2008 Ammonia Triggers Photodamage of Photosystem II in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. *Strain PCC 68031*. *Plant Physiology* 147: 206–215.
- Du Z. & Bramlage W. J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1566-1570.
- Fallahi E., Khemira H., Righetti T. L. & Azarenko A. N. 2002. Influence of foliar application of urea on tree growth, fruit quality, leaf minerals and distribution of urea-derived nitrogen in apples. *Acta Horticulturae (ISHS)* 594.
- Fallahi F.& Willemsem K. M. 2002. Blossom thinning of pome and stone fruit. *HortScience* 37: 474-477.
- Flaishman M. A., Shargal A., Stern R. A., Lev-Yadun S. & Grafi G. 2005. The synthetic cytokinins CPPU y TDZ prolong the phase of cell division in developing pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *Proc. IXth IS on Pear*
- Fleckinger J. 1965. Phénologie. Phénologie et Arboricultura Fruitière, *Bon Jardinier* 1 (2, part. C) : 362-372.
- Follmer C. 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 29: 18-28.
- Foyer C. H. & Noctor G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist* 146, 359-388
- Furuya S. & Umekiya Y. 2002. The influences of chemical forms on foliar-applied nitrogen absorption for peach trees. *Acta Horticulturae (ISHS)* 594
- García-Plazaola J. L., Hernández A. & Becerril J. M. 2003. Antioxidant and pigment composition during autumnal leaf senescence in woody deciduous species differing in their ecological Traits. *Plant Biology* 5: 557-566.

- Gerendás J. & Sattelmacher B. 1997^a. Significance of Ni supply for growth, urease activity and the concentrations of urea, amino acids and mineral nutrients of urea-grown plants. *Plant and Soil* 190: 153-162.
- Gerendás J. & Sattelmacher B. 1997^b. Significance of N source (urea vs. NH_4NO_3) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (*Cucurbita pepo* convar. *Giromontiina*). *Plant and Soil* 196: 217-222
- Gerendás J, Zhu Z. & Sattelmacher B. 1998. Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 48 (326): 1545-1554.
- Gerendás J. & Sattelmacher B. 1999. Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L grown with NH_4NO_3 or urea as N source. *Annals of Botany* 83: 65-71.
- Gimenez G., Dussi M. C., Reeb P. & Striebeck G. 2008. Ajuste de modelos de caída de frutos en perales cv. "Williams". Libro de resúmenes. XXXI Congreso Argentino de Horticultura. Mar del Plata, Argentina.
- Goffinet M. C., Robinson T. L. & Lakso A. N. 1995. A comparison of "Empire" apple fruit size and anatomy in unthinned and hand-thinned trees. *Journal of Horticultural Science* 70: 375-387.
- Graf H. & Hilbers J. 1995 Ausdünnungsbehandlungen beurteilt anhand von Fruchtgröße und Fruchtertrag. *Mitt. Obstb Versuchsr Jork* 50: 152-159.
- Graf H. 1996. Ausdünnungsempfehlungen für 1996. *Mitt. Abstb Versuchsr Jork* 51:156-160.
- Grassi G., Millard P., Gioacchini P & Tagliavini M. 2002. Measurements of xylem sap amino acid concentrations in conjunction with whole tree transpiration estimates spring N remobilization by cherry trees. *Plan Cell & Environment* 25: 1689-1699.
- Griffiths G., Leverentz M., Silkowski H, Gill N. & Sánchez-Serrano J.J. 2000. Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *Journal of Experimental Botany* 52 (349): 1363-1370.
- Guak S, Neilsen D., Millard P, Wendler R, Neilsen G. H. 2003. Determining the role of N remobilization for grown of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees by measuring xylem-sap N flux. *Journal of Experimental Botany* 54 (390): 2121-2131.
- Hanschack M. & Alexander A. 2002. Effect of nitrogen foliar fertilizers for blossom thinning on apples. *Acta Horticulturae (ISHS)* 594: 635-640.
- Harada T., Kurahashi W., Yanai M., Wakasa Y. & Satoh T. 2005. Involvement of cell proliferation and cell enlargement in increasing the fruit size of *Malus* species. *Scientia Horticulturae* 105: 447-456.
- Heath R. L. & Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Heldt H-W. 2005. *Plant biochemistry*.-Elsevier Academic press. United States of America. 630 pp.
- Hodges D. M., DeLong J. M., Forney C. F. & Prange R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.

- InfoStat (2009). InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Inzé D. & Van Montagu M. 1995. Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 153-158.
- Krogmeier M. J., McCarty G. W. & Bremner J. M. 1989. Phytotoxicity of foliar-applied urea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 8189-8191.
- Kronzucker H. J., Britto D. T., Davenport R. J. & Tester M. 2001. Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends in Plant Science* 6: 335-337.
- Lam H. M., Coschigano K. T., Oliveira I. C., Melo-Oliveira R. & Coruzzi G. M. 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 569-593.
- Lichtenthaler H. K. 1998. The stress concept in plants: An introduction. *Annals New York Academy of sciences*: 187-198
- Lim P. O., Kim H. J & Nam H. G. 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58: 115-136.
- Link H. 2000. Significance of flower and fruit thinning on fruit quality. *Plant Growth Regulation* 31: 17-26.
- Luna C. M., Gonzalez C. A. & Trippi V. S. 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant and Cell Physiology* 35: 11-15.
- Luna C. M., Casano M. L. & Trippi V. S. 1997. Nitrate reductase is inhibited in leaves of *Triticum aestivum* treated with high levels of copper. *Physiologia Plantarum* 101:103-108.
- Luna C. M., Casano M. L. & Trippi V. S. 2000^a . Inhibition of wheat nitrate reductase activity by zinc. *Biologia Plantarum* 43: 257-262.
- Luna C. M., García Seffino L., Arias C., Taleisnik E. 2000^b. Oxidative stress indicators as selection tools for salt tolerance in *Chloris gayana*. *Plant Breeding* 119: 341-345.
- Luna C. M., Pastori G. M., Driscoll S., Groten K., Bernard S & Foyer C. H. 2005. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany* 56 (411): 417–423.
- Luna C. M., Vargas Gil S., Bressano M., Curetti M., Benitez G., Ducasse D. & March G. J. 2006 *Glomus intraradices* como protector del daño oxidativo causado por *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium virguliforme* en soja. 3º congreso de soja del MERCOSUR. pág. 366-369.
- MacDaniels L. H. & Hildebrand E. M. 1940. A study of pollen germination upon the stigmas of apples flowers treated with fungicides. *Proceedings of American Society for Horticultural Science* 37:137-140.
- Mackown C. T., Brookes P. D. & Smith M. S. 1987. Diffusion of N¹⁵ Kjeldahl digest for isotope analysis. *Soil Science Society of American Journal* 51: 87-90.
- Malaguti D., Millard P., Wndler R., Hepburn A. & Tagliavini M. 2001. Translocation of amino acids in the xylem of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees in spring as a consequence of both N remobilization and root uptake. *Journal of Experimental Botany* 52: 1665-1671.

- Mann H., Bedford D., Luby J., Vickers Z. & Tong C. 2005. Relationship of instrumental and sensory texture measurements of fresh and stored apples to cell number and size. *HortScience* 40: 1815-1820.
- Millard P 1993. A review of internal cycling of nitrogen within trees in relation to soil fertility (623-628). En Fragoso M.A.C. & van Beusichem M.L. Optimization of plant nutrition. Kluwer Academic publishers. Netherlands
- Millard P. 1996. Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 159:1-10.
- Millard P., Wendler R., Hepburn A. & Smith A. 1998. Variations in the amino acid composition of xylem sap of *Betula pendula* Roth. Trees due to remobilization of stored N in the spring. *Plant Cell and Environment* 21: 715-722.
- Millard P., Wendler R., Grassi G., Aelle Grelet _G. & Tagliavini M. 2006. Measurement of the remobilization of N from storage: scaling up to field-grown cherry and poplar trees. *Tree Physiology* 26: 527-536.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.
- Møller I.M. Jensen P. E. & Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.
- Munné Bosch S. & Alegre L. 2002. Plant aging increase oxidative stress in chloroplast. *Planta* 214: 608-615.
- Neilsen D., Millard P., Neilsen G. H. & Hoghe E. J. 1997. Sources of N used for leaf growth in a high density apple (*Malus domestica*) trees in response to irrigation method and timing of N application. *Tree Physiology* 21: 513-521.
- Nelgen N. 1982. Über Beziehungen zwischen vegetativer Entwicklung, Fruchtentwicklung und Fruchtqualit  bei den Apfelsorten "Cox Orange", "Golden Delicious" und "Boskoop". Ph D.-thesis Univ Hohenheim. Alemania.
- Nielsen K. H. & Schjoerring J. K. 1998. Regulation of apoplastic NH_4^+ concentration in leaves of oilseed rape. *Plant Physiology* 118: 1361-1368.
- Predieri S., Norman H. A., Krizek D. T., Pillai P., Mirecki R. M. & Zimmerman R. H. 1995. Influence of UV-B radiation on membrane lipid composition and ethylene evolution in "Doyenne D'Hiver" pear shoots grown *in vitro* under different photosynthetic photon fluxes. *Environmental and Experimental Botany* 35: 151-160.
- Quartieri M., Millard P & Tagliavini M. 2002 Storage and remobilization of nitrogen by pear (*Pyrus communis* L.) trees as affected by timing of N supply. *European Journal of Agronomy* 17: 105-110.
- Rahemi M. & Ramezani A. 2007. Potential of ethephon, NAA, NAD and urea for thinning pistachio fruitlets. *Scientia Horticulturae* 111: 160-163.
- Rikans L. E. & Hornbrook K. R. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1362: 116-127.
- Ryugo K. 1988. Fruit culture: Its Science and art. John Wiley & Sons inc.

- Rodríguez A. B. & Muñoz A. R. 2006. Síntesis agrometeorológica para el período 1990-2004. EEA Alto Valle. Boletín de divulgación técnica N° 53. EEA Alto Valle. CR Patagonia Norte. General Roca, Argentina.
- Sánchez E. E. & Righetti T. L. 1990. Tree nitrogen status and leaf canopy position influence postharvest nitrogen accumulation and efflux from pear leaves. *Journal of American Horticultural Science* 115: 934-937.
- Sánchez E. E., Righetti T. L., Sugar D. & Lombard P. B. 1990^a. Response of 'Comice' pear trees to a postharvest urea spray. *Journal of Horticultural Science* 65: 541-546.
- Sánchez E. E., Righetti T. L., Sugar D. & Lombard P. B. 1990^b. Seasonal differences, soil texture and uptake of newly absorbed nitrogen in field-grown pear trees. *Journal of Horticultural Science* 65: 395-400.
- Sánchez E. E., Righetti T. L., Sugar D. & Lombard P. B. 1991. Recycling of nitrogen in field-grown Comice pears. *Journal of Horticultural Science* 66: 541-546.
- Sánchez E. E. 1999. Nutrición mineral de frutales de pepita y carozo. INTA E.E.A. Alto Valle. Río Negro, Argentina. 196p.
- Sánchez E., Sugar D. & Curetti M. 2007. Foliar application of urea during bloom increase fruit size in "William's" pear. 10^o International Pear Symposium. Portugal.
- Schröder M. 2001. Bedeutung und Wirkungsweise chemischer Ausdünnungsmittel beim Apfel am Beispiel von Ammoniumthiosulfat, Benzyladenin und Harnstoff. PhD. Thesis, University of Hohenheim. Alemania
- Schröder M. & Link H. 2002. Calcium content in apple fruits after thinning treatments in relation to crop load, fruit size and leaf area. *Acta Horticulturae (ISHS)* 594:541-545.
- Shargal A., Golobovich S. M., Yablovich Z., Shlizerman L. A., Stern R. A., Grafi G., Lev-Yadun S. & Flaishman M. A. 2006. Synthetic cytokinins extend the phase of division of parenchyma cells in developing pear (*Pyrus communis* L.) fruits. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 81: 915-920.
- Sirko A. & Brodzik R. 2000. Plant ureases: Roles and regulation. *Acta Biochimica polonica* 47: 1185-1195.
- Smirnoff N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58.
- Smirnoff, N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. *Environment and Plant Metabolism*:1243.
- Smirnoff N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion on Biotechnology* 9: 214-219.
- Sozzi G. O. 2007. Fisiología del crecimiento de los frutos. En: Árboles frutales: Ecofisiología, Cultivo y aprovechamiento. Sozzi G. O. (ed.) Buenos Aires, Argentina. pp. 3-38.
- Stern R. A. & Flaishman M. A. 2003. Benzyladenine effects on fruit size, fruit thinning and return yield of "Spadona" and "Coscia" pear. *Scientia Horticulturae* 98: 499-504.
- Stover E. W. & Greene D. W. 2005. Environmental effects on the performance of foliar applied plant growth regulators: A review focusing on tree fruits. *Hort Technology* 15:214-221.

- Sugiura T., Honjo H & Horimoto M. 1995. Measuring fruit cell size and estimating changes in the number of fruit cells by replica or video microscope. *HortScience* 30: 270-271.
- Tagliavini M., Quartieri M & Millard P. 1997. Remobilized nitrogen and root uptake of nitrate for leaf growth, flowers and developing fruits of pears (*P. communis*) trees. *Plant and Soil* 195: 37-142.
- Tagliavini M., Millard P. & Quartieri M. 1998. Storage of foliar absorbed N and remobilization for spring growth in young nectarine (*P. Persica var nectarina*) trees. *Tree Physiology* 18: 203-207.
- Tagliavini, M., Millard, P., Quartieri, M., Marangoni, B. 1999. Timing of nitrogen uptake affects winter storage and spring remobilization of nitrogen in nectarine (*Prunus persica* var. nectarina) trees. *Plant and Soil* 211: 149-153.
- Tagliavini M & Toselli M. 2004. Foliar nutrition of plants. *Encyclopedia of soils in the environment*. Italia.
- Tagliavini M. & Millard P. 2005. Fluxes of nitrogen within deciduous fruit trees. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus* 4: 21-30.
- Taiz L. & Zeiger E. 2002. *Plant physiology* (3^o Ed.). Sinauer associates. Sunderland, Massachusetts.
- Taulavuori E., Hellström E-K., Taulavuori K. & Laine K. 2001. Comparison of two methods used to analyze lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* 52 (365):2375-2380
- Toyama S. & Hayashi S. 1957. Studies on the fruit development of japanese pears. I On flesh cell-division and cell-enlargement and the relation between flesh cell-size and fruit size in some varieties. *Journal Hort. Ass. Japan*. 25: 274-278.
- Trinidad-Santos A & Aguilar-Manjares D. 1999. Fertilización foliar, un respaldo importante en el rendimiento de los cultivos. *Terra* 17: 247-255.
- Villarreal P. & Santagni A. 2004. Pautas tecnológicas: frutales de pepita. Manejo y análisis económico financiero. INTA EEA Alto Valle. General Roca, Argentina.
- Wang C., Zhang S. H., Wnag P. F., Hou J., Li W. & zhang W. J. 2008. Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* (L.) Hara. *Aquatic Toxicology* 87: 88-98.
- Wang W. H., Köhler B., Cao F. Q. & Liu L. H. 2008. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science* 175: 467-477.
- Webster A. D. 2002. Current approved thinning strategies for apples and pears and recent thinning research in Europe. *Compact Fruit Tree* 35: 73-76.
- Weinberger J. H., Prince V. E. & Havis L. 1969. Test on foliar fertilization of peach trees with urea. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 53: 26-28.

- Wertheim S. J. 1973. Chemical control of flower and fruit abscission in apple and pear. *Acta Horticulturae* (ISHS) 34: 321-331.
- Wertheim S. J. 1997. Chemical thinning of deciduous fruit trees. *Acta Horticulturae* (ISHS) 463: 445-462.
- Wertheim S. J. 2000. Developments in the chemical thinning of apple and pear. *Plant Growth Regulation* 31: 85-100.
- Westwood M. N. 1962. Seasonal changes in specific gravity and shape of apple, pear and peach fruits. *Proceeding of American Society for Horticultural Science* 80: 90-96.
- Westwood M. N., Batjer L. P. & Billingsley H. D. 1967. Cell size, cell number and fruit density of apples as related to fruit size, position in cluster and thinning method. *Proceeding of American Society for Horticultural Science* 91: 51-62.
- Westwood M. N. 1982. *Fruticultura de zonas templadas*. Ediciones multiprensa.
- Westwood M. N. 1993 *Temperate-zone pomology: Physiology and culture*. Timber press, Portland, OR, USA 523 pp.
- Williams M. W. 1973. Chemical thinning and guide for size thinning *Barlett* pears. *Acta Horticulturae* (ISHS) 69: 257-260.
- Williams M. W. 1994. Factor influencing chemical thinning and update on new chemical thinning agents. *Compact Fruit Tree* 27: 115-122.
- Williams L. E. & Miller A. J. 2001. Transporter responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 659-688.
- Wismer P. T., Proctor J. T. A. & Elfving D. C. 1995. Benzyladenine affects cell division and cell size during apple fruit thinning. *Proceeding of American Society for Horticultural Science* 120: 802-807.
- Witte C. P., Tiller S. A., Taylor M. A. & Davies H. V. 2002. Leaf urea metabolism in potato. Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of ¹⁵N after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiology* 128: 1129-1136
- Wójcik P. 2004. Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 12: 201-218.
- Zelitch I. 1961. Biochemical control of stomatal opening in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 47: 1423-1433.

- Zhang C. 2005 Evaluation of roles of carbon partitioning, cell division, cell expansion and gibberellins involved in fruit size of japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). PhD thesis, Tottori University, Japan, 110-138.
- Zhang C., Tanabe K, Tamura F., Itai A. & Wang S. 2005^a. Partitioning of ¹³C-photosynthate from spur leaves during fruit growth of three japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) cultivars differing in maturation date. *Annals of Botany* 95: 685-693.
- Zhang C., Tanabe K., Tamura F., Matsumoto K. & Yoshida A. .2005^b. ¹³C-photosynthate accumulation in japanese pear fruit during the period of rapid fruit growth is limited by the sink strength of the fruit rather than by the transport capacity of the pedicel. *Journal of Experimental Botany* 56 (420): 2713-2719.
- Zhang C., Tanabe K., Wang S., Tamura F. Yoshida A. & Matsumoto K. 2006. The impact of cell division and cell enlargement on the evolution of fruit size in *Pyrus pyrifolia*. *Annals of Botany* 98: 537-543.
- Zhang C., Lee U. & Tanabe K. 2008. Hormonal regulation of fruit set, parthenogenesis induction and fruit expansion in japanese pear. *Plant Growth regulation* 55: 231-240.
- Zhu Z., Gerendás J., Bendixen R., Schinner K., Tabrizi H., Sattelmacher B., & Hansen U-P. 2000. Different tolerated to Light stress in NO₃⁻ and NH₄⁺- grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Biology* 2: 558-570.
- Zilkah S., Klein I. & Feigenbaum S 1987. Translocation of foliar-applied urea 15N to reproductive and vegetative sinks of avocado and its effect on initial fruit set. *Proceeding of American Society for Horticultural Science* 112: 1061-1065.
- Zilkah S., Klein I. & David I. 1988. Thinning peaches and nectarines with urea. *Journal of Horticultural Science* 63:209-216.
- Zimmer J., Handschack M. & Lüdders P. 1996. Influence of flower thinning with nitrogen containing fertilizers on growth and fruit quality of apple. *Erwerbsobstbau* 38: 81-85.
- Zubeldía H. 2007. Breve comentario sobre el sector frutícola regional. Secretaría de fruticultura. Provincia de Río Negro.

7 ANEXO

7.1 Concentración foliar de nutrientes poscosecha

En la tabla I se presentan los valores de concentraciones foliares de nutrientes luego de las cosechas para los cuadros 5N1 y 5N4, así como los rangos de valores normales para cada nutriente para perales cv. *Williams* reportado por Sánchez, 1999.

Tabla I: Concentración foliar de nutrientes en perales cv. Williams en el mes de febrero

Cuadro	Temporada	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Mn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	B (ppm)	Zn (ppm)
5N1	2006-2007	0,18	1,35	1,73	0,33	38,9	96,9	8,4	37,2	22,5
	2007-2008	0,18	1,43	1,66	0,32	40,0	95,0	9,0	37,0	23,0
	2008-2009	0,17	1,33	1,68	0,32	38,9	96,3	8,5	39,7	20,9
5N4	2008-2009	0,18	1,36	1,72	0,37	38,6	96,6	7,7	39,1	21,1
Valores normales *		0,13- 0,45	1,20- 2,00	1,10- 2,50	0,24- 0,50	30 - 200	50 - 250	5 - 15	30 - 60	18 - 60

* Sánchez, 1999.

Los valores de nitrógeno se encuentran en los resultados del capítulo 4. El resto de las concentraciones de nutrientes en hoja se encuentra dentro del rango de valores normales reportado por Sánchez, 1999.

7.2 Madurez de la fruta en la cosecha

En la tabla II se encuentran los valores de parámetros de madurez de la fruta de cada cosecha realizada y los valores óptimos para peras cv. *Williams* reportados por Benítez (2001).

Tabla II. Parámetros de madurez de la fruta en el momento de la cosecha

Fecha Y cuadro	Tratamientos	Firmeza (libras/pulgada ²)	Sólidos Solubles (° Brix)	Acidez titulable (g/l)	Degradación del almidón (%)
17/01/2007 5N1	Testigo	19,0	10,9	4,2	50
	Urea al 5%	19,3	11,0	4,1	45
21/01/2008 5N1	Testigo	18,3	11,9	4,0	9,3
	Urea al 5%	17,9	11,7	4,2	5,3
12/01/2009 5N1	Testigo	18,2	11,0	4,3	48
	Urea al 7,5%	18,4	11,0	4,0	55
19/01/2009 5N4	Testigo	20,0	10,0	4,4	40
	Urea al 7,5%	19,8	10,5	4,5	38
Valores óptimos *		20-21	> 10	3 - 4	20 - 25

* Benítez, 2001

La firmeza de la fruta en las cosechas realizadas es algo menor al óptimo recomendado por Benítez (2001), sin embargo son valores aceptables. Por otro lado, la degradación del almidón excede el rango óptimo, aunque esto puede deberse al tiempo que transcurrió desde la cosecha hasta la puesta en la cámara de conservación, debido al laborioso proceso manual de tamañado.

7.3 Interferencias en la Absorbancia a 532 nm debido a azúcares y antocianinas

En la técnica de medición del MDA se han realizado dos importantes correcciones. La primera de ellas fue realizada por Du & Bramlage (1992) para descontar la interferencia en la medición de la absorbancia debido a azúcares (sacarosa y fructosa). La segunda corrección fue propuesta por Hodges *et al.* (1999) para detectar las interferencias en la medición de la absorbancia debido a antocianinas. Posteriormente, en base a mediciones de MDA sobre hojas de arándano a lo largo de la temporada, Taulavuori *et al.* (2001) mencionan que las interferencias encontradas en el otoño son mucho mayores. Los autores atribuyen esta mayor interferencia a la hidrólisis de almidón para la provisión de azúcares simples con función crioprotectora. Esta acumulación de azúcares favorece a su vez la formación de antocianinas, las cuales tienen a acumularse en esta estación.

En la tabla III se encuentran las magnitudes de las interferencias debidas a azúcares y antocianinas determinadas según Du & Bramlage (1992) y Hodges *et al.* (1999), para dos momentos: plena floración y finales del verano.

Tabla III Interferencias en la técnica de medición del malón di aldehído (MDA) debido a azúcares (fructosa y sacarosa) y antocianinas

Temporada	Momento	Interferencias en la Absorbancia debido a	
		Azúcares	Antocianinas
2007-2008	Primavera	0,05	0,08
	Fines del verano	0,10	0,23
		***	***
2008-2009	Primavera	0,05	0,08
	Fines del verano	0,11	0,20
		***	***

***: Diferencias significativas al 0,1%

En concordancia con Taulavuori *et al.* (2001), las interferencias son mayores hacia finales del verano respecto a la primavera, debido a una mayor presencia de azúcares y antocianinas, aún cuando las hojas muestreadas no presentaban ningún síntoma de senescencia.